

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEORGIA ERDMANN DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS
DA POLPA DE *Solanum betaceum***

CURITIBA

2013

GEORGIA ERDMANN DO NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS
DA POLPA DE *Solanum betaceum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Ciências Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

Geórgia Erdmann do Nascimento

CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA POLPA DE *Solanum betaceum*

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dra. Caroline Mellinger Silva

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Empraba Agroindústria de Alimentos

Curitiba

25 de janeiro de 2013

Orientador: Profa. Dra. Lucimara M. C. Cordeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Dedico este trabalho,
Às pessoas mais importantes da minha vida:
meus pais Erica e Jorge, meus irmãos Cristina e Sander,
meu sobrinho Marcelo e minha saudosa avó Dida (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que possibilita todas as coisas e capacita todas as pessoas, pela sua presença constante na minha vida sem que eu precise pedir, auxílio nas minhas escolhas e por ter me escolhido e permitido que eu chegasse até aqui.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, e em especial:

À minha orientadora professora Lucimara M. C. Cordeiro por ter confiado em mim e no meu crescimento científico, sempre ensinando com muita paciência e dedicação, além do carinho e da amizade.

Ao professor Marcello Iacomini, meu co-orientador, por ter me acolhido no grupo de pesquisa, pelo apoio, conselhos e por toda a disposição em discutir resultados.

Às professoras Maria Fernanda de Paula Werner e Cristiane Hatsuko Baggio do Departamento Farmacologia da Universidade Federal do Paraná por todo o auxílio na realização dos experimentos biológicos. E também à IC Letícia e à mestrandia Rosane pelo grande auxílio durante estes experimentos.

À minha família. Especialmente minha mãe, Erica, por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me ouvindo e incentivando. Certamente, esta conquista também é sua, amo você!

Ao meu pai, Jorge, que mesmo distante eu sei que torce pelo meu futuro e se orgulha com as minhas conquistas.

Aos meus irmãos Sander e Cristina, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho.

Às minhas amigas de antes e sempre, Cris, Lisa, Vales, Rafa e Pilinski, que mesmo muitas vezes distantes posso sentir a energia positiva de vocês. Obrigada pelo convívio e amizade sincera por todos esses anos, é muito bom saber que posso contar com vocês até ficarmos bem velhinhas.

O mesmo sentimento é compartilhado com minhas amigas de faculdade: Alana, Bruna, Beth, Letícia, Glaucia, Karin e Paty. Vocês são muito importantes para mim. E

em especial para a Tatiane, que me incentivou ao mestrado em Bioquímica, por sempre acreditar que eu conseguiria (como sempre digo: é tudo culpa da Tateee !!!).

Aos meus amigos da turma de mestrado, pelos momentos divididos juntos, particularmente à Thaísa. Iniciamos esse projeto juntas e compartilhamos muitas dúvidas, ela tornou-se uma verdadeira amiga e fez mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvir minhas bobagens. Muito bom poder contar com você!

À todo o pessoal dos laboratórios 247, 252 e E1, pelo apoio, cooperação, amizade e alegre convivência: Rafael, Nicolas, Vanessinha, Carolina, Daiana, Nady, Elisa, Simone, Aline, Fernanda Simas, Fhernanda Smirdele, Elaine, Carol Leivas, Márcia, Aramis, Ana Helena, Rhayla, Vassoler, Lauro, Arquimedes, Camila, Nessana, Alex, Diego Popó, Yanna, Juliane, Larry, Flávio e a Rainha Kassandra. Um agradecimento especial à Andréa pela amizade, conversas, paciência e a disposição de sempre ajudar e esclarecer as dúvidas constantes.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, pelo auxílio e empréstimo de materiais.

À Alceu e Maria Mach, pelo gentil fornecimento dos frutos de tamarillo, sem os quais esse trabalho não seria realizado.

À banca examinadora.

Ao Luciano pelo auxílio na dosagem de acetil-esterificação.

Ao Prof. Guilherme e ao Arquimedes pelas análises de RMN.

À Elisangela pelas análises de HPSEC.

À Rosane pelas análises em GC-MS.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao Programa REUNI e à CAPES, pelo suporte financeiro e ao PRONEX Carboidratos.

Muito Obrigada!!!

**“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é
consentido ficar crianças toda a vida.”**

Albert Einstein

RESUMO

O tamarillo (*Solanum betaceum*), conhecido também pelo nome popular de tomate de árvore, é um fruto tropical exótico nativo dos Andes, de alto valor nutricional e utilizado em diversas preparações culinárias. Na medicina popular existem relatos de seu uso principalmente como antinociceptivo e anti-inflamatório. Como não existem na literatura trabalhos que caracterizem a estrutura química dos polissacarídeos presentes no fruto e que os relacionem com propriedades biológicas, este trabalho teve como objetivo elucidar a estrutura química dos polissacarídeos presentes na polpa do fruto maduro do tamarillo, bem como verificar o efeito antinociceptivo de uma galactoarabinoglucuronoxilana purificada. Os frutos, descascados e sem sementes, foram liofilizados e moídos, e após a deslipidificação com clorofórmio-metanol (1:1), a polpa foi submetida à extrações aquosas e alcalinas (KOH 10%) sob refluxo. A partir do extrato aquoso foi isolada e caracterizada (a) uma arabinana linear (1→5) ligada (PTW-Amil), (b) uma fração péctica contendo uma homogalacturonana (HG) altamente metil esterificada (DE = 71%, e DA = 1,3%) (PPF), provavelmente com inserções de ramnogalacturonana tipo I (RG-I) contendo cadeias laterais constituídas principalmente por arabinogalactanas tipo I (AG-I), e (c) uma arabinogalactana do tipo I presente nas frações AG-I 50E e 50R, contendo uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Galp (1→4) ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de α -L-Araf. Já a partir do extrato alcalino foram purificadas e caracterizadas duas galactoarabinoglucuronoxilanas (STK-1000R e PF), contendo uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-Xylp (1→4) ligadas, exclusivamente ramificadas em O-2. Aquela presente em STK-1000R é menos ramificada que a encontrada na fração PF, com cadeias laterais formadas por unidades de α -L-Araf (1→5) ligadas, α -D-GlcpA (1→4) ligadas e terminais não redutores formados por α -L-Araf, β -Arap, β -D-Galp, α -D-GlcpA e 4-O-Me- α -D-GlcpA. A administração intraperitoneal da fração STK-1000R mostrou redução significativa na contorção abdominal induzida por 0,6% de ácido acético e na fase inflamatória da nocicepção induzida por 2,5% de formalina em camunondongos, indicando que o efeito da galactoarabinoglucuronoxilana na dor é através de mecanismos anti-inflamatórios.

Palavras chave: Tamarillo. *Solanum betaceum*. Arabinana linear. Homogalacturonana. Arabinogalactanas tipo I. Galactoarabinoglucuronoxilana. Efeito antinociceptivo.

ABSTRACT

The tamarillo (*Solanum betaceum*), also known by the popular name as tree tomato it is an exotic fruit tropical, native from the Andes, with high nutritional value and used in various culinary preparations. In folk medicine there are reports of its use primarily as anti-nociceptive and anti-inflammatory. Once there are no reports in the literature that characterize the chemical structure of polysaccharides present in this fruit and that relate to biological properties, this study aimed to elucidate the chemical structure of polysaccharides present in the pulp of the ripe fruit of tamarillo and evaluated the antinociceptive effect of a purified galactoarabinoglucuronoxylan. The fruits, pelled and without seeds, were freeze-dried and milled, and after defatted with chloroform-methanol (1:1), the pulp was subjected to aqueous and alkaline (aq. 10% KOH) extractions, under reflux. From the aqueous extract was isolated and characterized (a) a linear α -arabinan (1 \rightarrow 5)-linked (PTW-Amil); (b) a pectic fraction (PPF) containing a homogalacturonan (HG) highly methyl-esterified (DE = 71%, and DA = 1.3%), possibly with inserts of type I rhamnogalacturonan (RG-I) containing side chains mainly consisting of type I arabinogalactans (AG-I), and (c) a type I arabinogalactan present in fractions AG-I 50E and 50R, having a main chain composed by β -D-Galp (1 \rightarrow 4)-linked units, partially substituted in *O*-3 by α -L-Araf units. From the alkaline extract were purified and characterized two galactoarabinoglucuronoxylans (STK-1000R and PF) containing a backbone composed by β -D-Xylp (1 \rightarrow 4)-linked units exclusively branched at *O*-2. The galactoarabinoglucuronoxylan present in STK-1000R is less branched than that found in PF fraction, with side chains formed by units of α -L-Araf (1 \rightarrow 5)-linked, α -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)-linked and non-reducing end formed by α -L-Araf, β -Arap, β -D-Galp, α -D-GlcpA and 4-*O*-Me- α -D-GlcpA units. The intraperitoneal administration of STK-1000R fraction showed a significant reduction in abdominal constriction induced by 0.6% acetic acid and in the inflammatory phase of nociception induced by formalin in 2.5% mice, indicating that the effect of the galactoarabinoglucuronoxylan on pain is through anti-inflammatory mechanisms.

Keywords: Tamarillo. *Solanum betaceum*. Linear arabinan. Homogalacturonan. Arabinogalactans type I. Galactoarabinoglucuronoxylan. Antinociceptive effect.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	VARIABILIDADE DOS FRUTOS QUANTO A COLORAÇÃO DAS CASCAS, POLPA E MUCILAGENS QUE ENVOLVEM AS SEMENTES DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>).....	18
FIGURA 2.	MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>) (A) INDICANDO SUA ORIGEM E OS LUGARES ONDE FOI INTRODUZIDA COMO PLANTA EXÓTICA E NAS REGIÕES ESCURAS DO MAPA EM (B) ONDE A PLANTA É ENCONTRADA NO BRASIL.....	19
FIGURA 3.	ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA VEGETAL.....	23
FIGURA 4.	HETEROGENEIDADE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE PLANTA.....	24
FIGURA 5.	TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>).....	41
FIGURA 6.	ESQUEMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA POLPA DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>) POR EXTRAÇÃO AQUOSA.....	43
FIGURA 7.	ESQUEMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA POLPA DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>) POR EXTRAÇÃO ALCALINA.....	44
FIGURA 8.	PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>).....	57
FIGURA 9.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO PTW (A) E DA ARABINANA LINEAR PRESENTE NA FRAÇÃO PTW-AMIL (B).....	58
FIGURA 10.	ESPECTRO DE HSQC DA ARABINANA LINEAR PRESENTE NA FRAÇÃO PTW-AMIL.....	59
FIGURA 11.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STW E STW-AMIL.....	61
FIGURA 12.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO STW-AMIL.....	62
FIGURA 13.	REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE RMN- ¹ H DAS FRAÇÕES STW-AMIL UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METIL-ESTERIFICAÇÃO (DE).....	63
FIGURA 14.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES PPF (A) E PSF (B).....	65
FIGURA 15.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES PPF E PSF.....	66
FIGURA 16.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES SSF (A) E SPF (B).....	67

FIGURA 17.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES SSF, SPF, 50E E 50R.....	69
FIGURA 18.	TLC DA FRAÇÃO 50R OBTIDA DA POLPA DO TAMARILLO (<i>S. betaceum</i>)	70
FIGURA 19.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES 50E (A) E 50R (B).....	71
FIGURA 20.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO PTK.....	75
FIGURA 21.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STK, STK300R E STK300E.....	76
FIGURA 22.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES STK300R (A) E STK300E (B).....	77
FIGURA 23.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STK-1000R E STK-1000E.....	78
FIGURA 24.	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES STK-1000E (A), STK-1000R (B) E PF (C).....	79
FIGURA 25.	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES SF E PF.....	82
FIGURA 26.	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO STK-1000R NA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR 0,6% DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	85
FIGURA 27.	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO STK-1000R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (<i>S.betaceum</i>).....	57
TABELA 2.	ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 50R POLPA DE TAMARILLO (<i>S.betaceum</i>).....	72
TABELA 3.	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (<i>S.betaceum</i>).....	74
TABELA 4.	ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES STK-1000R E PF OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (<i>S.betaceum</i>).....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- Deslocamento químico
AG-I	- Arabinogalactana tipo I
4- <i>O</i> -Me- α -D-GlcpA	- 4- <i>O</i> -Metil- α -D-ácido glucurônico
AG-II	- Arabinogalactana tipo II
Ara	- Arabinose
CDTA	- Ácido ciclohexano-1,2-diaminotetra-acético
CH ₃ I	- Iodeto de metila
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
CR	- Carboxirreduzida
D ₂ O	- Óxido de deutério
DA	- Grau de acetilação
DE	- Grau de esterificação
DEPT-135	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
<i>f</i>	- furanosídico
Gal	- Galactose
GalA	- Ácido galacturônico
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	- Glucose
GlcA	- Ácido glucurônico
GLC	- Cromatografia líquido – gasosa
HG	- Homogalacturonana
HM	- <i>High methoxyl pectin</i> – pectina de alta metoxilação
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy</i>
i.p.	- Intraperitoneal
KOH	- Hidróxido de potássio
LM	- <i>Low methoxyl pectin</i> – pectina de baixa metoxilação
Man	- Manose
Me	- Grupamento metil (-CH ₃)
NaBD ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	- Hidróxido de Amônio
<i>p</i>	- Piranosídico
ppm	- Partes por milhão
RG	- Ramnogalacturonana
RG -I	- Ramnogalacturonana tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana tipo II
Rha	- Ramnose
RMN- ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TFA	- Ácido trifluoroacético
Xyl	- Xilose

FRAÇÕES

50E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 50 kDa da extração aquosa
50R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 50 kDa da extração aquosa
PF	- Fração precipitada de Fehling, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
PF-STW	- Fração precipitada de Fehling, após extração aquosa, sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
PPF	- Fração precipitada na diálise obtida do precipitado de Fehling, após extração aquosa sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
PSF	- Fração precipitada na diálise obtida do sobrenadante de Fehling, após extração aquosa sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
PTK	- Fração precipitada do congelamento e degelo, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo
PTK-Amil	- Fração precipitada do congelamento e degelo e tratada com α -amilase, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo
PTW	- Fração precipitada do congelamento e degelo, após extração aquosa sob refluxo
PTW-Amil	- Fração precipitada do congelamento e degelo e tratada com α -amilase, após extração aquosa sob refluxo
SF	- Fração sobrenadante de Fehling, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
SF-STW	- Fração sobrenadante de Fehling, após extração aquosa, sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
SPF	- Fração sobrenadante na diálise obtida do precipitado de Fehling, após extração aquosa sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
SSF	- Fração sobrenadante na diálise obtida do sobrenadante de Fehling, após extração aquosa sob refluxo, congelamento e degelo e tratamento com α -amilase
STK	- Fração sobrenadante do congelamento e degelo, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo
STK-1000E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 1000 kDa da extração alcalina
STK-1000R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 1000 kDa da extração alcalina
STK-300E	- Fração eluída na ultrafiltração em membrana de 300 kDa da extração alcalina
STK-300R	- Fração retida na ultrafiltração em membrana de 300 kDa da extração alcalina
STK - Amil	- Fração sobrenadante do congelamento e degelo e tratada com α -amilase, após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo
STW	- Fração sobrenadante do congelamento e degelo, após extração aquosa sob refluxo
STW - Amil	- Fração sobrenadante do congelamento e degelo e tratada com α -amilase, após extração aquosa sob refluxo
TK	- Fração polissacarídica obtida após extração alcalina com KOH a 10%, sob refluxo, da polpa de tamarillo
TW	- Fração polissacarídica obtida após extração aquosa, sob refluxo, da polpa de tamarillo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>SOLANUM BETACEUM</i>	18
2.1.1 Características botânicas e fitogeografia	18
2.1.2 Principais formas de utilização do fruto	20
2.1.3 Composição química do fruto.....	20
2.2 POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS	22
2.2.1 Pectinas.....	24
2.2.2 Hemiceluloses.....	28
2.3 POLISSACARÍDEOS DE FRUTAS	30
2.3.1 Caracterização estrutural	30
2.3.2 Modificações durante o amadurecimento.....	32
2.3.3 Comparação da composição monossacarídica de frutas.....	33
2.3.4 Polissacarídeos de Solanáceas	34
2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA	36
2.5.1 Atividades biológicas de polissacarídeos de plantas	36
2.5.2 Atividade antinociceptiva de polissacarídeos de plantas.....	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS.....	41
4.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA.....	41
4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	42
4.3.1 Extração aquosa exaustiva.....	42
4.3.2 Extração alcalina.....	42
4.4 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	42
4.4.1 Fracionamento dos polissacarídeos por Congelamento e Degelo	44
4.4.3 Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling	45
4.4.4 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração e diálise	46
4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	46

4.5.1 Composição monossacarídica	46
4.5.2 Análise de metilação.....	47
4.5.3 Carboxirredução	48
4.6.1 Dosagem de ácidos urônicos	49
4.6.2. Determinação da homogeneidade e massa molar.....	49
4.6.3 Cromatografia de Camada Delgada (TLC)	50
4.6.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	50
4.6.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)	51
4.6.6 Determinação do grau de <i>O</i> -metil esterificação por RMN- ¹ H	51
4.6.7 Determinação do grau de <i>O</i> -acetil esterificação por espectrofotometria	52
4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS	52
4.7.1 Animais.....	53
4.7.2 Avaliação da atividade antinociceptiva de polissacarídeos no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	53
4.7.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos	54
4.7.4 Análise Estatística	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA.....	56
5.1.1 Purificação e caracterização estrutural: arabinana linear	58
5.1.2 Purificação e caracterização estrutural: Frações Pécticas.....	60
5.2 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO ALCALINA.....	73
5.2.1 Purificação e caracterização estrutural: galactoarabinoglucuronoxilanas	75
5.3 ENSAIO BIOLÓGICO DA GALACTOARABINOGLUCURONOXILANA ISOLADA	84
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

O tamarillo, *Solanum betaceum* (Cav.) é conhecido no Brasil pelos nomes populares de tomate de árvore, tomate chimango, tomate francês, tomate da serra, tomate japonês, entre outros. O tamarilheiro é uma árvore frutífera subtropical, de origem Andina, que pertence à família Solanaceae. Essa família é constituída por cerca de 106 gêneros e 2300 espécies, e possui grande relevância como fonte de alimentos, fonte de compostos de interesse farmacêutico, de alcalóides esteroidais e de compostos fenólicos. Entre os membros dessa família estão o tomate, a batata, a pimenta e a berinjela (BOHS, 1989; BOHS, 1994).

Fruto exótico, de alto valor nutricional, o tamarillo é utilizado em diversas preparações culinárias, e existem relatos de seu uso na medicina popular, principalmente como antinociceptivo e anti-inflamatório (BOHS, 1989). Dentre os poucos dados científicos a respeito dos componentes químicos presentes no tamarillo, encontram-se estudos sobre seu conteúdo elevado de vitaminas e de minerais, e estudos referentes aos seus compostos bioativos (BOBBIO, BOBBIO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1983; LISTER *et al.*, 2005; ROSSO e MERDADANTE, 2007; MERTZ *et al.*, 2009; VASCO *et al.*, 2009; OSÓRIO *et al.*, 2012).

Quanto aos polissacarídeos do tamarillo ainda não existem trabalhos na literatura que caracterizem suas estruturas químicas. De acordo com as suas estruturas químicas, os polissacarídeos podem exibir um grande número de propriedades terapêuticas benéficas, tais como antivirais, anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais, imunomoduladoras, anticoagulantes, antitrombóticas e antiúlcera gástrica (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1989; YANG e ZHANG, 2009).

Desta maneira, este estudo visa caracterizar a estrutura química fina e avaliar a atividade antinociceptiva de polissacarídeos do tamarillo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Solanum betaceum*

Primeiramente, a planta foi chamada pela sinonímia de *Solanum betaceum* pelo botânico espanhol Cavanilles e depois transferido para *Cyphomandra betacea* por Sendtner voltando a ser conhecida como *Solanum* por Bohs (1995), podendo ser encontrado na literatura publicações utilizando uma das duas nomenclaturas, embora o nome oficial seja *S. betaceum*.

2.1.1 Características botânicas e fitogeografia

Planta arbustiva, a espécie *S. betaceum* possui várias variedades que podem ser distinguíveis pela cor do fruto. As cores das cascas podem ser roxa, vermelha, laranja ou amarela, ou laranja com amarelo e podem apresentar ainda estrias longitudinais de coloração verde-escura a marrom. A cor da polpa varia entre o laranja-avermelhado, do laranja para o amarelo ou amarelo-creme e as mucilagens que envolvem as sementes são púrpuras ou escuras nas frutas roxas e vermelhas e amarelas nas frutas amarelas e alaranjadas (MORTON, 1987) (FIGURA 1).



FIGURA 1. VARIABILIDADE DOS FRUTOS QUANTO À COLORAÇÃO DAS CASCAS, POLPA E MUCILAGENS QUE ENVOLVEM AS SEMENTES DO TAMARILLO (*S. betaceum*)

O fruto maduro apresenta muitas sementes, tem forma elíptica, tem pele lisa, e atinge de 4 a 10 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura e aroma delicado e característico. A pele fina possui sabor amargo, o mesocarpo é carnoso variando de sabor suave a adstringente, e as mucilagens são doces quando o fruto está maduro (BOHS, 1989; BOYES e STRUBI, 1997; PROHENS e NUEZ, 2005).

A espécie é cultivada em regiões subtropicais ou regiões temperadas e apresenta como centros de dispersão as encostas andinas do Peru e da Bolívia. Plantações foram estabelecidas em diversos locais como na Colômbia, Equador, Haiti e Nova Zelândia, locais cujo cultivo comercial é realizado em larga escala, e é também produzido em menor escala no México e Argentina (FIGURA 2A). No Brasil a planta, ainda que bem adaptada a Amazônia, centro-oeste e às regiões sul e sudeste (FIGURA 2B), com uma produção anual estimada de 20 a 30 kg/árvore, é encontrada principalmente em jardins ou em pequenos cultivos, podendo ser encontrado à venda apenas em supermercados sofisticados das regiões sul e sudeste (MORTON, 1987; BOHS, 1989; BOHS, 1994).

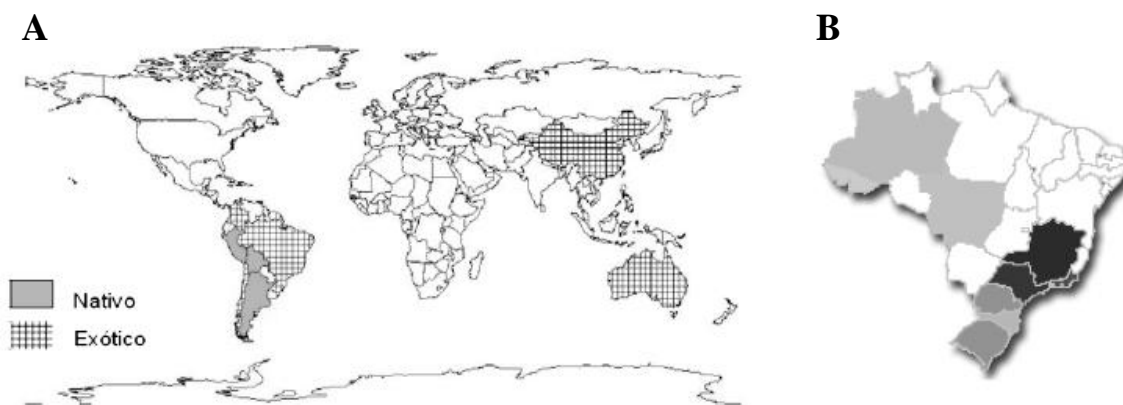


FIGURA 2. MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO TAMARILLO (*S. betaceum*) (A) INDICANDO SUA ORIGEM E OS LUGARES ONDE FOI INTRODUZIDA COMO PLANTA EXÓTICA (adaptado de ORWA *et al.*, 2009) E NAS REGIÕES ESCURAS DO MAPA EM (B) ONDE A PLANTA É ENCONTRADA NO BRASIL (adaptado de STEHMANN *et al.*, 2011)

2.1.2 Principais formas de utilização do fruto

O tamarillo tem grande potencial para o consumo *in natura* e em diversas preparações culinárias, como saladas, molhos, geléias, sorvetes, sucos e licores.

Poucos usos terapêuticos da planta foram relatados, entre eles, a utilização das folhas aquecidas enroladas ao pescoço como remédio para a dor de garganta no Equador, e de cataplasma da polpa dos frutos para amídalas inflamadas na Colômbia (BOHS, 1989). Na medicina popular mexicana, o fruto com pele, é usado como antimicrobiano e anti-inflamatório no tratamento de dores de garganta e de gengivas inflamadas, bem como o uso do alimento para redução do colesterol, o que levou Vasco e colaboradores (2009) a estudar seus compostos fenólicos. Porém, o efeito medicinal do fruto não pode ser explicado pela sua eficácia antioxidante, considerada neste estudo baixa em relação à de outros frutos.

Entretanto, Kou e colaboradores (2009) concluíram que o consumo dos frutos de tamarillo preveniu contra aterosclerose e doenças neurodegenerativas. Efeito atribuído principalmente pelos seus compostos fenólicos, que apresentaram proteção contra a oxidação da LDL e da oxidação induzida pelo estresse das células neuronais PC12.

Em outro trabalho, Ordóñez e colaboradores (2006), ao estudar proteínas extraídas dos frutos maduros, isolaram uma proteína inibidora de invertase, de baixo peso molecular, que apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro tanto para bactérias quanto para fungos.

2.1.3 Composição química do fruto

O consumo do fruto é recomendado pela sua alta qualidade nutricional e baixo teor de calorias. Os níveis das vitaminas B₆, C e E de apenas um tamarillo suprem mais de 10% da ingestão alimentar de referência (DRI – *Dietary Reference Intakes*) desses nutrientes. Para alguns minerais como o ferro, magnésio e potássio, um ou dois

tamarillos suprem mais de 5% da DRI (LISTER *et al.*, 2005), sendo o conteúdo de potássio similar ao da banana (VASCO *et al.*, 2009).

Os dados sobre os componentes químicos do tamarillo são limitados. Entre os compostos bioativos identificados destacam-se os carotenóides, antocianinas, leucoantocianinas e flavonóides. O tamarillo também possui alcalóides esteroidais do tipo espirosolanos, solasodina e tomatidenol, considerados fonte alternativa na síntese de esteróides de interesse farmacêutico (BOBBIO, BOBBIO e RODRIGUEZ-AMAYA, 1983; ROSSO e MERCADANTE, 2007; MERTZ *et al.*, 2009; OSORIO *et al.*, 2012), e contém três lectinas isoladas da parede celular dos tecidos e tegumento, entre elas uma aglutinina (XU *et al.*, 1992; SAMPIETRO *et al.*, 2001).

O teor de açúcares (frutose, glucose e sacarose) presentes é relativamente baixo comparado ao de outras frutas tropicais (PANTOJA *et al.*, 2009). Vasco e colaboradores (2009) encontraram um conteúdo de fibras de aproximadamente 3% (1% de fibra solúvel e 2% de fibras insolúveis); com uma distribuição relativa de aproximadamente 630 mg de celulose e 1400 mg de hemicelulose por 100 g de peso fresco; conteúdo de lignina de 1681 mg para variedade amarela e 1045 mg para variedade vermelha por 100 g de peso fresco; e conteúdo de ácido galacturônico de 1230 e 846 mg/100g de peso fresco para a variedade amarela e vermelha, respectivamente.

2.2 POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS

Moléculas com extraordinária complexidade estrutural, os polissacarídeos e glicoproteínas estão presentes nas paredes que envolvem as células de plantas em crescimento, as assim chamadas paredes celulares (MCNEIL *et al.*, 1984).

A parede celular das plantas é altamente organizada, apresentando muitas classes de polissacarídeos diferentes que são divididas em pectinas, hemiceluloses e celulose (FIGURA 3). A forma, composição e estrutura da parede celular vegetal são continuamente alteradas ao longo da vida celular em resposta ao crescimento, diferenciação, ambiente e atividades da célula (CARPITA e MCCANN, 2000).

A composição da parede celular primária das dicotiledôneas, de fundamental importância no processo de expansão celular é, tipicamente, 25-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% material péctico e 5-10% proteínas e proporções muito pequenas de compostos fenólicos. Já a parede celular secundária, que se encontra entre a primária e a membrana plasmática da célula, e confere rigidez aos tecidos vegetais, é muito mais espessa que a parede primária e consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina (DEY, BROWNLEADER e HARBORNE, 1997).

A conversão da parede primária em secundária ocorre após o processo de lignificação, o qual interrompe o crescimento celular, e indica, portanto, o amadurecimento celular e a diferenciação terminal da célula (ALBERSHEIM *et al.*, 1996).

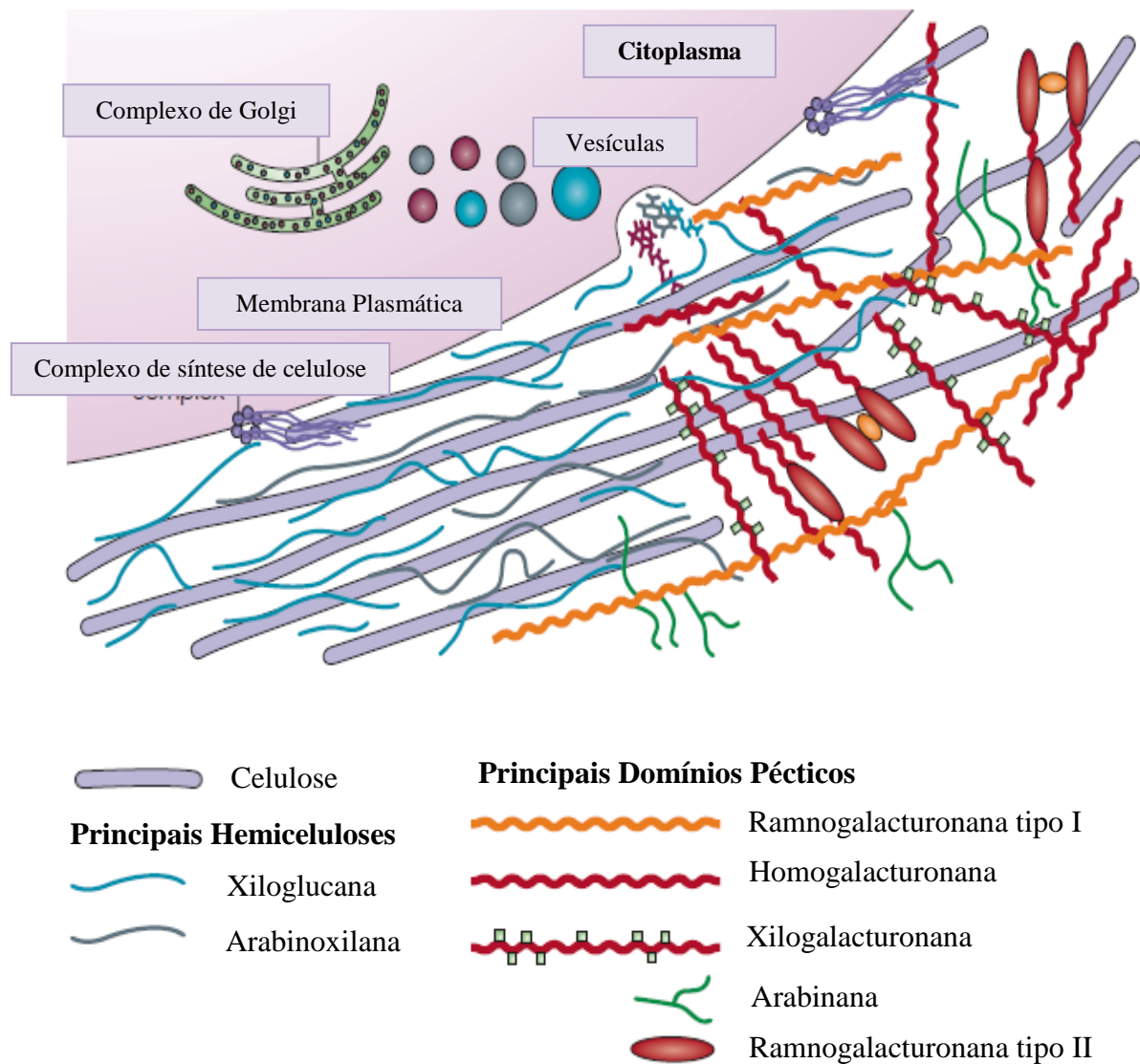


FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR PRIMÁRIA VEGETAL (Adaptado de COSGROVE, 2005)

A heterogeneidade dos polissacarídeos constituintes das paredes celulares de plantas é reconhecida desde as primeiras análises químicas realizadas com isolados de parede celular, e provavelmente é maior que a relatada, devido à dificuldade de extração desses polissacarídeos (FIGURA 4) (BURTON, GIDLEY e FINCHER, 2010). Consequentemente, a extração, a caracterização da estrutura química e da conformação das cadeias dos polissacarídeos não é uma tarefa fácil, mas são importantes para o entendimento de suas atividades biológicas (YANG e ZHANG, 2009).

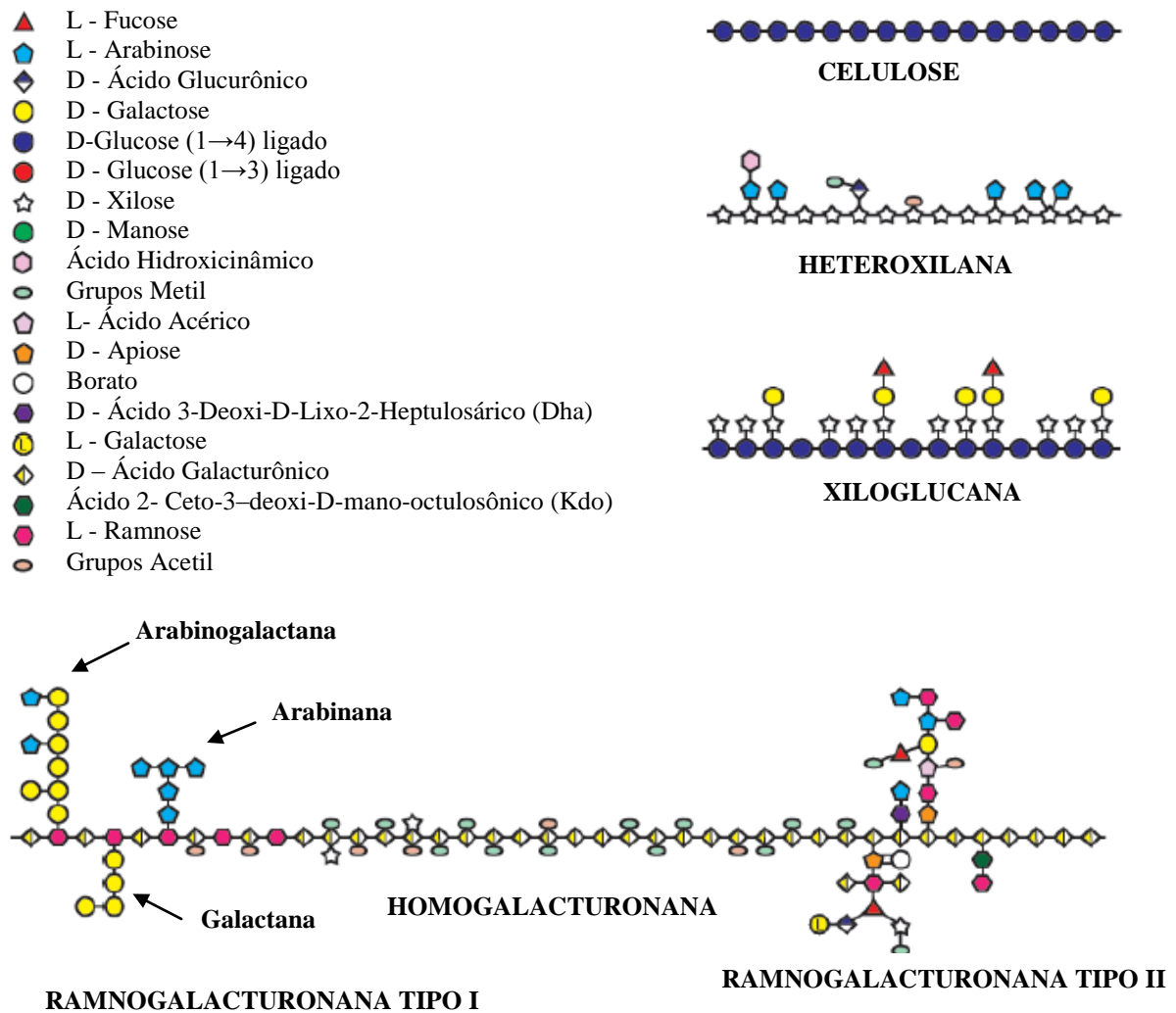


FIGURA 4. HETEROGENEIDADE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS (Adaptado de BURTON *et al.*, 2010)

2.2.1 Pectinas

Pectinas são, estrutural e funcionalmente, os polissacarídeos mais complexos da parede celular das plantas. As pectinas tem função no crescimento, na morfologia, no desenvolvimento, na defesa da planta e também servem como polímeros geleificante e estabilizantes em diversos produtos alimentícios e da indústria cosmética, além de possuírem efeitos positivos na saúde humana e diversos usos biomédicos (CAFFAL e MOHNEN, 2009).

As pectinas podem ser compostas por até 17 diferentes monossacarídeos, dos quais o ácido D-galacturônico (D-GalA) é o mais abundante, seguido por D-galactose e L-arabinose (YAPO, 2011).

A estrutura fina de muitas pectinas não é claramente conhecida. Primeiro, foi descrito como uma tríade dos homopolímeros, homogalacturonana (HG), arabinana e galactana, antes de ser demonstrado que açúcares neutros como, L-ramnose, L-arabinose, D-galactose e D-xilose podem ser incorporados em macromoléculas de galacturonanas. Estudos com vários elementos estruturais pécticos não HG, ou seja, xilogalacturonana (XGA), apiogalacturonana (APGA), ramnogalacturonanas-I (RG-I), ramnogalacturonanas-II (RG-II), galactogalacturonanas (GGA), arabinogalacturonanas (ArGA), galacturonogalacturonanas (GaGA), de vários materiais vegetais permitiram que pectinas fossem vistas como um grupo de polissacarídeos extremamente complexo e estruturalmente diverso (MOHNEN, 2008; BURTON, GIDLEY e FINCHER, 2010; YAPO, 2011).

As homogalacturonanas (HG), também referidas como galacturonanas lineares, ácido poligalacturônico, poligalacturonídios ou regiões lineares (*smooth regions*) de pectinas complexas, são polímeros formados por unidades de D-GalpA ligadas (1→4), independentemente da origem vegetal. As unidades de D-GalpA podem ser parcialmente metil-esterificadas no C6 e acetil-esterificadas nas posições O-2 e/ou O-3, dependendo da origem vegetal (YAPO, 2011). O grau de metil-esterificação e de acetilação das HGs têm profundo impacto nas propriedades funcionais das pectinas, sendo responsáveis pelo comportamento de geleificação das pectinas (WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

A proporção de grupos carboxílicos metil-esterificados nas pectinas é expressa como grau de esterificação (DE). As pectinas de alta metoxilação (HM – *High methoxyl pectin*) apresentam 50% ou mais dos seus grupos carboxílicos esterificados, enquanto que as de baixa metoxilação (LM – *Low methoxyl pectin*) possuem menos de 50% destes grupos esterificados (ROLIN, 1993).

O padrão e o nível de metil-esterificação e de acetilação variam de fonte para fonte. A hipótese de metil-esterificação está envolvida na regulação do desenvolvimento tecido específica. As unidades de GalA não metiladas no C6 são

negativamente carregados e podem interagir ionicamente com Ca^{2+} para formar um gel estável com outras moléculas de pectinas, se mais de 10 unidades de GalA não metil-esterificados estiverem coordenados. O complexo HG - cálcio *in vivo* é muitas vezes referido como modelo da caixa de ovo (*egg - box*) e ocorre na formação de géis de pectinas LM (RIDLEY, O'NEILL e MOHNEN, 2001; COSGROVE, 2005; WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006). Enquanto pectinas HM formam géis pela formação de ligações cruzadas entre unidades de GalpA através de ligações de hidrogênio e por forças hidrofóbicas entre os grupos metoxil presentes (VORAGEN *et al.*, 1995; O'NEILL, DARVILL e ALBERSHEIM, 2001; WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

As homogalacturonanas podem estar envolvidas no controle da porosidade da parede celular, na integridade, na rigidez relativa, nas propriedades mecânicas, na adesão intercelular e no ambiente iônico. Homogalacturonanas lineares são o principal elemento estrutural de pectinas da parede celular, o que representa 55-70% da quantidade total de pectinas (YAPO, 2011).

Já as ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) são geralmente polissacarídeos altamente ramificados e formados por uma cadeia principal constituída por repetições do dissacarídeo $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$, parcialmente substituída principalmente nas posições em O-4 e/ou O-3 (menos presente) nas unidades de L-Rhap por uma única unidade neutra glicosil ou por cadeias laterais poliméricas de diferentes tipos, tais como $(1\rightarrow 5)\ \alpha\text{-L-arabinanas}$, $(1\rightarrow 4)\ \beta\text{-D-galactanas}$, arabinogalactanas tipo I (AG-I), arabinogalactanas tipo II (AG-II), e possivelmente galactoarabinanas. As cadeias laterais das RG-I relativamente longas e numerosas são muitas vezes chamadas de regiões cabeludas (*hairy regions*) das pectinas (MOHNEN, 2008; YAPO, 2011).

Estudos de imunocitoquímica sugerem que a presença e a localização de arabinanas e galactanas nas cadeias laterais de RGs são correlacionadas frequentemente com o estágio da célula e/ou desenvolvimento tecidual. A relativa flexibilidade e elasticidade das paredes celulares são provavelmente determinadas pela cadeia principal, bem como por cadeias laterais de arabinanas de RG-I. Alterações na

firmeza dos tecidos durante o amadurecimento das frutas estão relacionadas com a degradação das cadeias laterais de arabinanas e de galactanas (YAPO, 2011).

Ramnogalacturonanas tipo II possuem a cadeia linear constituída por unidades de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas e com cerca de 11-12 diferentes tipos de unidades glicosil interligados por mais de 20 diferentes ligações glicosídicas, o que resulta em macromoléculas altamente complexas (YAPO, 2011).

A estrutura geral das xilogalacturonanas (XGA) compreende uma cadeia linear com unidades de α -D-GalpA (1 \rightarrow 4) ligadas, parcialmente substituídas na posição *O*-3 por uma única unidade de β -D-Xylp e/ou por uma cadeia formada por 2-8 unidades, ligadas (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 2,3), (1 \rightarrow 2,4), (1 \rightarrow 3,4). A xilose pode estar também ligada na posição *O*-2 da cadeia de GalpA. As cadeias laterais de β -D-xilanas de XGAs são frequentemente substituídas por α -L-Araf, α -L-Fucp e β -D-Galp e os dois últimos podem ser substituídos em *O*-4 e *O*-4/*O*-6 respectivamente, por unidades de β -D-Glcp (MOHNEN, 2008; YAPO, 2011).

Xilogalacturonanas são encontradas frequentemente em tecidos de reserva de órgãos de reprodução e, portanto, podem ter funções especializadas nestes tecidos, embora tenham sido encontradas em tecidos de órgãos não reprodutores (raízes, caules e folhas) de plantas diversas sugerindo uma maior variedade de funções (YAPO, 2011).

As arabinogalactanas (AG) compõem, em parte, as cadeias laterais das RG-I, no entanto, podem existir independentemente das pectinas na parede celular, sendo assim, podem ser considerados polissacarídeos pécticos ou hemicelulósicos. As arabinogalactanas de plantas superiores foram classificadas por Aspinall (1973) em dois grandes grupos ao constatar diferenças nas ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destas macromoléculas. As que apresentavam cadeia principal de (1 \rightarrow 4) β -D-galactanas foram denominadas arabinogalactanas tipo I (AG-I), enquanto as que tinham cadeia principal formada por (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) β -D-galactanas foram classificadas como arabinogalactanas tipo II (AG-II).

As arabinogalactanas tipo I, também chamadas de pécticas, são compostas por cadeias de (1 \rightarrow 4) β -D-galactanas e são encontradas geralmente associadas às RG-I. Elas apresentam, na maioria das vezes, unidades de arabinose ligadas no *O*-3 das

galactoses (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Já as AG-II constituem um amplo grupo de cadeias curtas de (1→3) e (1→6) β-D-galactanas conectadas umas às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6 e apresentam a maior parte das posições O-3 e O-6 restantes ocupadas por unidades de arabinose (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

Arabinogalactanas tipo II são aparentemente mais distribuídas nos tecidos das plantas em comparação com as AG-I (CLARKE, ANDERSON e STONE, 1979). Apesar de apresentarem uma estrutura geral semelhante, a estrutura fina das AG-II varia muito de espécie para espécie (CARPITA e GIBEAUT, 1993; ALBERSHEIM *et al.*, 1996). A composição monossacarídica geralmente apresenta variações, podendo o conteúdo de arabinose atingir até 80%. Também podem ser observados monossacarídeos ácidos, como o ácido glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico (STEPHEN, 1983). As AG-II estão presentes na parede celular vegetal, ramificando ou não as RG (STEPHEN, 1983). Elas podem também, estar ligadas a proteínas, constituindo uma classe de proteoglicanas denominadas arabinogalactanas-proteínas (AGP) (FINCHER, STONE e CLARKE, 1983; VARNER e LIN, 1989).

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose, especialmente em tecidos lignificados (ASPINALL, 1973). A função principal das hemiceluloses em tecidos vegetais é unir microfibrilas de celulose, fortalecendo assim a parede celular (COSGROVE, 2005).

São hemiceluloses: xilanas (homoxilanas, heteroxilanas neutras e ácidas), glucomananas, mananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas, calose (β-glucanas com ligações 1→3), β-glucanas (1→3), (1→4) ligadas e arabinogalactanas tipo II (ASPINALL, 1980). Este último tipo de polissacarídeo também pode estar presente em frações pécticas, associado a moléculas de RG-I (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

As xilanas são os biopolímeros mais abundantes, depois da celulose, sintetizados pelas plantas (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992) e são os principais polissacarídeos não celulósicos das paredes celulares de angiospermas, gramíneas e cereais (STEPHEN, 1983). As xilanas apresentam grande variedade estrutural, mas normalmente apresentam uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Xylp (1 \rightarrow 4) ligadas, substituídas em O-2 e/ou O-3 por diferentes grupos ou cadeias laterais. Essas cadeias laterais consistem principalmente de ácido α -D-glucurônico, ácido 4-O-metil- α -glucurônico e ocasionalmente unidades de alguns açúcares neutros (α -L-Araf, α -D-Xylp ou α -D-Galp). Entre os grupos laterais mais comuns estão os grupos acetil, os ácidos fenólicos, e os ácidos ferúlico e coumárico (EBRINGEROVÁ e HROMÁDKOVÁ, 1999). A presença de grupos acetil em xilanas pode não ser determinada quando elas são extraídas com álcali, o qual remove estes grupamentos (VIERHUIS *et al.*, 2001).

Heteroxilanas neutras ou arabinoxilanas foram extensivamente estudadas na parede celular de endosperma de cereais. Elas contêm somente unidades de L-Araf, geralmente (1 \rightarrow 3) ligadas, ou (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2) ligadas nas unidades de xiloses em arabinoxilanas mais substituídas ou com maiores extensões de cadeias laterais de L-Araf ligadas à outros substituintes (MCNEIL *et al.*, 1984). O grau de substituição da cadeia principal por unidades de Araf determina o nível de solubilidade da xilana e a habilidade de se ligar à celulose (IZYDORCZYK, MACRI e MACGREGOR, 1998; HAN, 2000).

Em dicotiledôneas as xilanas são principalmente ácidas, onde a cadeia principal encontra-se substituída por unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurônico ou ácido D-glucurônico (BAZUS *et al.*, 1993; DINAND e VIGNON, 2001; GHOSH *et al.*, 2005; HABIBI e VIGNON, 2005; ANGONE *et al.*, 2009; SENGKHAMPARN *et al.*, 2009).

2.3 POLISSACARÍDEOS DE FRUTAS

Os termos ‘fruto’ e ‘fruta’ embora bem parecidos, possuem por si significados diferentes, o que muitas vezes proporciona dúvidas quanto à maneira correta de classificá-los. Para essa revisão, não foi adotado o significado botânico (fruto), sendo utilizado, portanto, a designação genérica para esses termos (fruta), aplicada popularmente a frutos e pseudofrutos comestíveis e adocicados.

2.3.1 Caracterização estrutural

Na literatura poucos estudos enfocam a caracterização da estrutura química fina de polissacarídeos encontrados em frutas. Dentre estes trabalhos, a maioria envolve frações pécticas, como por exemplo, o estudo realizado com a maçã-de-elefante (*Limonia acidissima*) que possui polissacarídeos altamente esterificados, com cadeias laterais formadas principalmente por arabinose (1→5 e 1→3,5) ligadas e galactose (1→3,6) ligadas, e por pequenas quantidades de unidades de galactose (1→2,4 e 1→3) ligadas (MONDAL *et al.*, 2002). Outros estudos realizados foram com a polpa do cajá (*Spondias cytherea*), no qual foi caracterizada uma RG-I com ramificações de AG-I (IACOMINI *et al.*, 2005); e com os frutos da jujubeira (*Ziziphus jujuba* Mill.) que apresenta uma HG com 7,5% de metoxilação, e uma HG intercalada com RG na cadeia principal e ramificadas por cadeias laterais compostas por unidades de Araf (1→5) ligadas e por Galp (1→4) ligadas (ZHAO *et al.*, 2006). Do extrato aquoso da polpa do pêssogo (*Prunus persica* L.) foi isolada uma HG e uma AG-II (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2012), e na polpa da manga espada (*Mangifera indica* L.) e do maracujá (*Passiflora edulis*) foram caracterizadas uma HG e uma RG-I (IAGHER, REICHER e GANTER, 2002; SILVA *et al.*, 2012). Ainda, uma pectina altamente metoxilada foi extraída do endocarpo da bergamota (*Citrus depressa*) (TAMAKI *et al.*, 2008).

Pectinas contribuem em mais de 70% dos polissacarídeos da parede celular da nêspera (*Eriobotrya japonica* L.) e diferenças no nível de ramificação, de esterificação

e nas quantidades de cálcio e magnésio associados às pectinas foi detectada dependendo do tecido estudado (epicarpo, mesocarpo e tegumento) (FERMENIA *et al.*, 1998). Os polissacarídeos da laranja doce (*Citrus sinensis*), importante fonte de pectinas de valor comercial, contêm 55% de polissacarídeos pécticos, incluindo HG, RGs, juntamente com AG-I e arabinana e apenas 14% de hemiceluloses, entre elas xiloglucanas (10%), heteromananas e heteroxilanas (PRABASARI *et al.*, 2011). No suco de Noni (*Morinda citrifolia*) a fração polissacarídica consiste predominantemente de GalpA (53,6%), Araf (13,6%), Galp (17,9%) e Rhap (9,5%) e a análise de ligação confirma a presença de HG, RG-I, AG-I, AG-II, arabinana (1→5 e 1→3,5) e de pequenas quantidades de xiloglucana, heteroxilana e heteromanana (BUI, BACIC e PETTOLINO, 2006).

Na parede celular da polpa das uvas encontram-se duas vezes mais arabinogalactanas-proteínas (AGPs) e pectinas que na pele, e há três vezes mais RG-I e RG-II na pele que na polpa (VIDAL *et al.*, 2001) e, em ambos os tecidos xiloglucanas similares às encontradas em outras dicotiledôneas estão presentes (DOCO *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos da goiaba (*Psidium guajava* L.) são predominantemente neutros (~ 55 a 60%), sendo eles formados por celulose, xiloglucana, xilana, arabinana, AG-I e AG-II associados com HG fracamente metil-esterificada e apresentam similar composição entre o mesocarpo e endocarpo (MARCELIN, WILLIAMS e BRILLOUET, 1993).

Polissacarídeos neutros também foram purificados da fruta de Bael (*Aegle marmelos*), com predominância de cadeias principais formadas por ligações (1→4) de glucose e galactose, ramificadas em O-6 e O-3 respectivamente (BASAK, MANDAL e MUKHERJEE, 1981), e na amora branca (*Fructus Mori Albae*), na qual foi encontrada uma galactomanana, formada por uma cadeia principal de unidades de manose (1→3) ligadas e ramificações em O-6 por unidades de galactose e glucose (WEI *et al.*, 2007).

Uma alta proporção de xiloglucanas foi encontrada na parede celular do caqui (*Diospyros kaki* L.) (CUTILLAS-ITURRALDE *et al.*, 1998). Na fruta exótica, longan (*Dimocarpus longan* Lour.), duas frações solúveis em álcali foram isoladas, essas

frações são constituídas por cadeia principal de unidades de β -Xylp ($> 60\%$) ($1\rightarrow 3$ e $1\rightarrow 3,4$) ligadas substituídas por unidades de arabinose (JIANG *et al.*, 2009).

No abacaxi, as glucuronoarabinoxilanas (GAX) são os principais polissacarídeos não celulósicos. Xiloglucanas também estão presentes, junto com pequenas quantidades de pectinas e glucomananas (ou galactoglucomananas) (SMITH e HARRIS, 1995).

Em relação ao kiwi, foram estudadas duas variedades, o amarelo (*Actinidia chinensis*) e o verde (*Actinidia deliciosa*). O kiwi amarelo apresenta maior conteúdo de hemicelulose e menor conteúdo de pectinas quando comparado ao kiwi verde. O fracionamento sequencial indicou que os tipos de polissacarídeos são similares entre as duas variedades, sendo encontradas HG, RG, AG-I, AG-II, xilana ácida e xiloglucana (REDGWELL, MELTON e BRASCH, 1988).

2.3.2 Modificações durante o amadurecimento

O conteúdo e a caracterização estrutural dos polissacarídeos de frutas dependem da espécie, estágio do desenvolvimento e tipo de tecido celular (BROWNLEADER *et al.*, 1999). Muitos estudos envolvendo os polissacarídeos de frutas são dedicados às alterações da textura que ocorrem durante o processo de maturação e armazenamento. Processos que podem exercer um efeito cooperativo sobre outros atributos sensoriais como aroma, cor, sabor.

Alterações físicas e físico-químicas da parede celular foram estudadas durante o desenvolvimento do figo (*Ficus carica* L.) (OWINO *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2006), do mamão formosa (*Carica papaya*) (MANRIQUE e LAJOLO, 2004), de duas variedades de pêra (“*Marguerite Marillat*” e “*La France*”) (MURAYAMA *et al.*, 2002) e do caqui (*Diospyros kaki* L.) (ASGAR, YAMAUCHI e KATO, 2004), os quais demonstram redução dos principais componentes dos polissacarídeos pécticos. Na jabuticaba, a celulose e hemiceluloses são os principais polissacarídeos do fruto inteiro, da polpa e da pele. O conteúdo de pectinas é muito menor e diminui ainda mais

conforme o desenvolvimento e amadurecimento das bagas (MAGALHÃES, BARROS e FINGER, 1996).

Além da degradação das frações pécticas, alguns estudos, demonstram uma substancial degradação das frações hemicelulósicas, principalmente de xiloglucanas durante o amadurecimento de algumas frutas, como no caso do tomate (*Lycopersicon esculentum*) (SAKURAI e NEVINS, 1993), da manga (*Mangifera indica* L.) (YASHODA, PRABHA e THARANATHAN, 2005) e do abacate (*Persea americana* Mill) (SAKURAI e NEVINS, 1997). Já no amadurecimento da banana verifica-se uma diminuição de frações pécticas e de amido, além da diminuição da concentração de xilose e glucose nas frações hemicelulósicas, indicando um aumento da degradação de xilanas e glucanas (PRABHA e BHAGYALAKSHMI, 1998; CHENG *et al.*, 2009).

2.3.3 Comparação da composição monossacarídica de frutas

Outros estudos avaliam somente a composição monossacarídica presentes nas frutas. Comparando a composição monossacarídica do gênero *Prunus*, Renard e Ginies (2009) verificaram que as ameixas (*P. domestica* L., *P. salicina* Lindl. e *P. insititia* Lindl.) apresentam maior conteúdo de galactose e xilose e menos arabinose do que o pêssego, a nectarina (*P. persica* L.) e o damasco (*P. armeniaca*).

Galactose é o principal monossacarídeo neutro não celulósico da parede celular dos frutos das cucurbitáceas (pepino, melão, melão cantaloupe e abóbora) e das solanáceas (tomate, pimentão e pimenta), a xilose o principal componente de bagas (mirtilo, framboesa, amora preta e morango), e a arabinose das pomóideas (maçã e pêra). Em geral, as paredes das células de bagas possuem comparativamente menores teores de galactose e arabinose. Já em frutas com caroço o principal monossacarídeo neutro varia. Na nectarina, pêssego, ameixa e damasco os açúcares principais são arabinose, galactose e xilose, respectivamente. (GROSS e SAMS, 1984).

Na polpa da pitaia (*Hylocereus* sp.) as frações pécticas são compostas principalmente de arabinose, galactose e ácido urônico (~ 32%), já as frações

hemicelulósicas por glucose, xilose e galactose (RAMIREZ-TRUQUE, ESQUIVEL e CARLE, 2011). No litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) foi purificado um polissacarídeo neutro constituído por 65,6% de unidades de manose, 33% de galactose e 1,4% de arabinose (YANG *et al.*, 2006).

Diferenças entre a composição monossacarídica das dicotiledôneas (limão e maracujá) e das monocotiledôneas (abacaxi e banana) foram examinadas por Yapo (2009). Nas dicotiledôneas estudadas a parede celular é mais rica em GalA que nas monocotiledôneas. Sugerindo que essas contêm maiores quantidades de pectinas que as monocotiledôneas. Entretanto, o maracujá possui menores quantidades de pectinas em comparação ao limão, e a parede celular da banana tem mais pectinas que o abacaxi.

2.3.4 Polissacarídeos de Solanáceas

Com relação ao tamarillo (*Solanum betaceum*) não há até o momento nenhum estudo que caracterize seus polissacarídeos. Quanto aos polissacarídeos de frutas de outras espécies pertencentes à mesma família, poucos trabalhos foram realizados.

Das frutas exóticas encontradas nessa família, o Goji (*Lycium barbarum*) e o cálice do fisális (*Physalis alkekengi* var. *francheti*) foram estudados. No Goji as RGs com diferentes graus de ramificação são os principais polissacarídeos, mas também é encontrada uma glucana, uma 4-*O*-metil-glucuronoxilana e há indicação da presença de uma xiloglucana e uma manana (WANG *et al.*, 2011). Também foi caracterizado uma AGP típica de outras fontes e uma AGP incomum, substituída em *O*-4 por unidades de GlcpA nas cadeias laterais (QIU *et al.*, 2010). No fisális quatro frações polissacarídicas foram estudadas (uma constituída principalmente por arabinose, outra por xilose, glucose e frutose, a terceira por ramnose, manose e frutose e a última por ramnose, frutose, glucose e galactose), todas com grande atividade antioxidante (CHEN, JIANG e ZHAO, 2010).

Das xiloglucanas encontradas nas solanáceas somente 40% das unidades de β -Glc_p (1→4) possuem ligação glicosil *O*-6 na cadeia lateral com uma unidade de α -D-Xyl_p, e 60% das unidades de α -D-Xyl_p são substituídas subsequentemente por ligações em *O*-2 com unidades de α -L-Araf, sendo chamadas, portanto, de arabinoxiloglucanas (AXGs). Resultado que difere do encontrado na maioria das dicotiledôneas que possuem ramificações em *O*-6 ligadas em 75% das unidades de β -Glc_p (1→4) ligadas, e 50% das unidades de α -D-Xyl_p substituídas subsequentemente por unidades de β -D-Galp (1→2) ligadas ou pelo dissacarídeo α -L-Fuc_p-(1→2)- β -D-Galp. E AXGs de algumas solanáceas, como a batata, também contém substituintes β -D-Galp em *O*-2 de algumas de unidades de α -D-Xyl_p (YORK *et al.*, 1996).

Para estabelecer a ordem de como ocorrem as substituições nas AXGs de solanáceas, York e colaboradores (1996) analisaram oligossacarídeos secretados por células de tabaco e de tomate cultivadas *in vitro*. Os resultados confirmaram que as AXGs das duas espécies da família das solanáceas são compostas por uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Glc_p (1→4) ligadas e substituídas em *O*-6 por várias cadeias laterais, as quais são compostas por α -D-Xyl_p e α -L-Araf-(1→2)- α -D-Xyl_p. Entretanto, nos oligossacarídeos do tomate também foram encontrados cadeias laterais contendo o dissacarídeo β -D-Galp (1→2) α -D-Xyl_p e o trissacarídeo β -D-Araf (1→3)- α -L-Araf-(1→2)- α -D-Xyl_p, que não foram encontradas nas AXGs do tabaco.

Houben e colaboradores (2011) compararam a composição da parede celular do brócoli, cenoura e do tomate. Os frutos do tomate mostraram pectinas com maior grau de metoxilação, maior massa molecular, maior linearidade geral e menor grau de ramificação de RG-I, apontando para uma pectina linear particularmente longa no tomate em relação aos outros órgãos vegetais estudados e pertencentes a outras famílias taxonômicas, sugerindo possíveis implicações para o comportamento funcional, como a textura e propriedades reológicas.

Pectinas do fruto do tomate altamente metoxiladas mostraram alto grau de esterificação (~88%) quando comparadas com pectinas cítricas (~81%), consideradas portanto, um bom ingrediente para geleificação e emulsificação de alimentos (SHARMA, LIPTAY e MAGUER, 1998). Seymour e colaboradores (1990) também estudaram os polissacarídeos do tomate e compararam os polissacarídeos pécticos

sólúveis em CDTA e em carbonato de sódio, e encontraram que ambas as frações possuíam uma cadeia principal de ramnogalacturonana, porém menos ramificada no primeiro caso, e as cadeias laterais eram compostas principalmente por unidades de β -Galp (1 \rightarrow 4) ligadas e por unidades de α -Araf (1 \rightarrow 5) ligadas. Nesse mesmo estudo a principal hemicelulose encontrada foi uma xiloglucomanana, além de pequenas quantidades de xilana complexada com pectina.

Duas frações de galactoglucomanana e glucuronoxilana complexadas foram purificadas do tomate, por Prakash e colaboradores (2012), sendo a composição dessas ligeiramente alterada durante o amadurecimento do fruto, sem apresentar mudança no peso molecular, indicando que não eram hidrolizados durante o amadurecimento, possivelmente havendo uma atividade de transglicosilação, que poderia remodelar em vez de enfraquecer a parede celular o que permitiria que a epiderme dos frutos mantenha a flexibilidade e a plasticidade para resistir à quebra e infecção quando o fruto está maduro.

2.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.5.1 Atividades biológicas de polissacarídeos de plantas

Os polissacarídeos de plantas têm atraído atenção como uma importante classe de moléculas bioativas seguras e com poucos efeitos adversos. Muitos polissacarídeos derivados de plantas superiores são relativamente não tóxicos e não causam significantes efeitos colaterais, os quais constituem uns dos maiores problemas associados com polissacarídeos isolados de bactérias e compostos sintéticos (OVODOV, 1998; INNGJERDINGEN *et al.*, 2005).

As atividades biológicas dos polissacarídeos de plantas estão correlacionadas a uma variedade de parâmetros estruturais, como composição monossacarídica, tipo e

configuração da ligação glicosídica, tamanho dos pontos de ramificação e peso molecular (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1989; YAMADA, 1994; YANG e ZHANG, 2009).

Uma vasta variedade de atividades biológicas já foi relatada, tanto em ensaios “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, tais como: antiviral (MANDAL *et al.*, 2010), antitumoral (GAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2011; ZONG, CAO e WANG, 2012), antidepressiva (WANG *et al.*, 2010), antitussígena (KARDOSOVÁ *et al.*, 2002), antioxidante (NERGARD *et al.*, 2005; PRISTOV, MITROVIC e SPASOJEVIC, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2012), anticoagulante (YOON *et al.*, 2002), anti-inflamatória (INNGJERDINGEN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007; POPOV *et al.*, 2011), antinociceptiva (YI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011), hipoglicemiante (TOMODA *et al.*, 1989), hipocolesterolêmica (DALL'AGNOL e VON POSER, 2000), gastroprotetora (NERGARD *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009; CORDEIRO *et al.*, 2012) e, reguladora intestinal (KOROPATKIN, CAMERON e MARTENS, 2012). Com um maior número de trabalhos envolvendo as atividades imunomodulatória (SILVA, TOSTES e PARENTE, 2000; CAPEK *et al.*, 2003; GAN *et al.*, 2004; NERGARD *et al.*, 2005; BARRETO e PARENTE, 2006; LIU *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2006; INNGJERDINGEN *et al.*, 2007; YI *et al.*, 2012) e anticomplemento (YAMADA *et al.*, 1985; TOMODA *et al.*, 1989; DIALLO *et al.*, 2001; TOGOLA *et al.*, 2008; BARSETT *et al.*, 2012).

2.5.2 Atividade antinociceptiva de polissacarídeos de plantas

A dor é um dos principais sintomas clínicos que levam os pacientes a procurarem os centros de atendimento médico. Nesse sentido, a dor aguda exerce um importante papel biológico, atuando como um mecanismo de defesa para manter a integridade do organismo. Do ponto de vista sensorial, estímulos nocivos de natureza mecânica, térmica ou química ativam os nociceptores (fibras do tipo C e A δ), responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia para o sistema nervoso

central (MILLAN, 1999). Após uma lesão tecidual, ocorre a instalação do processo inflamatório devido à liberação de mediadores endógenos como prostanoídes (PGs), neuropeptídeos (SP), bradicina (BK), aminas (serotonina, histamina), citocinas (interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), aminoácidos excitatórios (GLU), óxido nítrico (NO), entre outros, os quais podem facilitar a transmissão nociceptiva e/ou sensibilizar os nociceptores (MILLAN, 1999). Além disso, sabe-se que a administração desses mediadores promovem comportamentos nociceptivos, caracterizados pelo ato dos animais de morder, lamben ou chacoalhar a área injetada, indicando a ativação do nociceptor (DRAY, 1995; MILLAN, 1999).

O potencial antinociceptivo e/ou analgésico de polissacarídeos isolados de plantas superiores é pouco explorado comparado aos estudos investigando suas ações imunomoduladoras, tendo poucos relatos desses efeitos.

Entre as pesquisas sobre atividade anti-inflamatória de polissacarídeos de plantas encontram-se estudos realizados com extratos aquosos de polissacarídeos obtidos de sementes de *Semen sterculiae lychnophorae* (WU *et al.*, 2007) e de lótus (*Nelumbo nucifera*) (LIAO, GUO e LIN, 2011), com substâncias pécticas encontradas no fruto do pimentão (POPOV *et al.*, 2011), em vagens de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea pods*) (PEREIRA *et al.*, 2012) e ainda com arabinogalactanas do tipo I e RG-II encontradas na planta medicinal *Glinus oppositifolius* (INNGJERDINGEN *et al.*, 2005), entre outros.

Frações polissacarídicas do mesocarpo do fruto de babaçu e das flores de *Cyrtopodium cardiochilum* apresentam atividade anti-inflamatória, inibindo o aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético (SILVA e PARENTE, 2001; BARRETO e PARENTE, 2006). Polissacarídeos pécticos extraído da parte aérea da planta *Comarum palustre* inibiram o edema de pata induzido por formalina em ratos, e a adesão de leucócitos peritoneais *in vitro* (POPOV *et al.*, 2005). Além disso, polissacarídeos ácidos de talos de aipo inibiram a migração de leucócitos peritoneais *in vivo* (OVODOVA *et al.*, 2009). Porém, estes estudos foram realizados com frações polissacarídicas brutas e os mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos polissacarídeos ainda são pouco compreendidos.

Em animais experimentais é possível avaliar o componente inflamatório em modelos de nocicepção química, como por exemplo, nos modelos de dor visceral induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético ou através da injeção intraplantar de formalina.

A injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos é um modelo com pouca especificidade, mas com boa sensibilidade para avaliar a dor visceral de origem inflamatória, sendo considerada uma ferramenta para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novas drogas (LE BARS, GOZARIU e CADDEN, 2001). Por outro lado, o modelo da formalina, que consiste na injeção do alôgênio (substância capaz de produzir dor) na pata dos animais, permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (RODRIGUES *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Não há na literatura estudos que caracterizem a estrutura química dos polissacarídeos do tamarillo (*Solanum betaceum*). O presente trabalho tem por objetivo geral caracterizar a estrutura química fina de polissacarídeos da polpa do tamarillo (*Solanum betaceum*). Além de avaliar o efeito dos polissacarídeos extraídos quanto às propriedades analgésicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para a realização dos objetivos acima, o trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

- Extrair os polissacarídeos da polpa dos frutos de *S. betaceum*, utilizando extração aquosa e alcalina;
- Purificar os polissacarídeos extraídos;
- Caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos purificados;
- Investigar o potencial antinociceptivo dos polissacarídeos purificados em modelos de dor aguda com componente inflamatório *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS

Os tamarillos maduros (*Solanum betaceum*), da variedade laranja, foram coletados na cidade de Prudentópolis, Estado do Paraná - Brasil (FIGURA 5). Exemplares da planta foram depositados no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e registrados sob o número UPCB 72896.



FIGURA 5. TAMARILLO (*S. betaceum*). Fonte: O AUTOR

4.2 EXTRAÇÃO LIPÍDICA

O fruto foi manualmente descascado com o auxílio de uma faca, cortado ao meio e as sementes foram removidas. A polpa foi pesada (1,2 kg), congelada e liofilizada. Em seguida, a polpa desidratada (235 g) foi transformada em pó com a ajuda de um gral de porcelana e pistilo e depois deslipidificada e despigmentada através da extração sequencial dos lipídeos com metanol – clorofórmio (1:1, v/v) em aparelho de Soxhlet. O material residual foi seco a temperatura ambiente e os extratos reunidos e evaporados até secura, para cálculo do rendimento dos lipídeos.

4.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.3.1 Extração aquosa exaustiva

O material residual deslipidificado (173 g) foi tratado com água destilada (1 L), sob refluxo por 2 horas, a 100 °C e, em seguida centrifugado a 8.000 rpm por 20 min, a 15 °C, para separação do extrato aquoso do material residual. As extrações foram realizadas até que houvesse exaustão completa de carboidratos, totalizando 7 extrações. Os extratos reunidos foram concentrados em rotaevaporador, tratados com excesso de etanol (3:1 v/v) para precipitação dos polissacarídeos, centrifugados, dialisados e liofilizados. Os sobrenadantes etanólicos foram evaporados até secar em evaporador rotatório e liofilizados para obtenção de carboidratos de baixa massa molar.

4.3.2 Extração alcalina

O resíduo resultante das extrações aquosas foram tratados quatro vezes com solução aquosa de hidróxido de potássio a 10% (1 L), por 2 horas sob refluxo, a 100 °C. Os extratos foram filtrados após cada etapa, neutralizados com ácido acético glacial, dialisados e liofilizados.

4.4 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos obtidos a partir das extrações aquosas e alcalinas foram submetidos a diversos processos de purificação, quando necessário. Os processos de

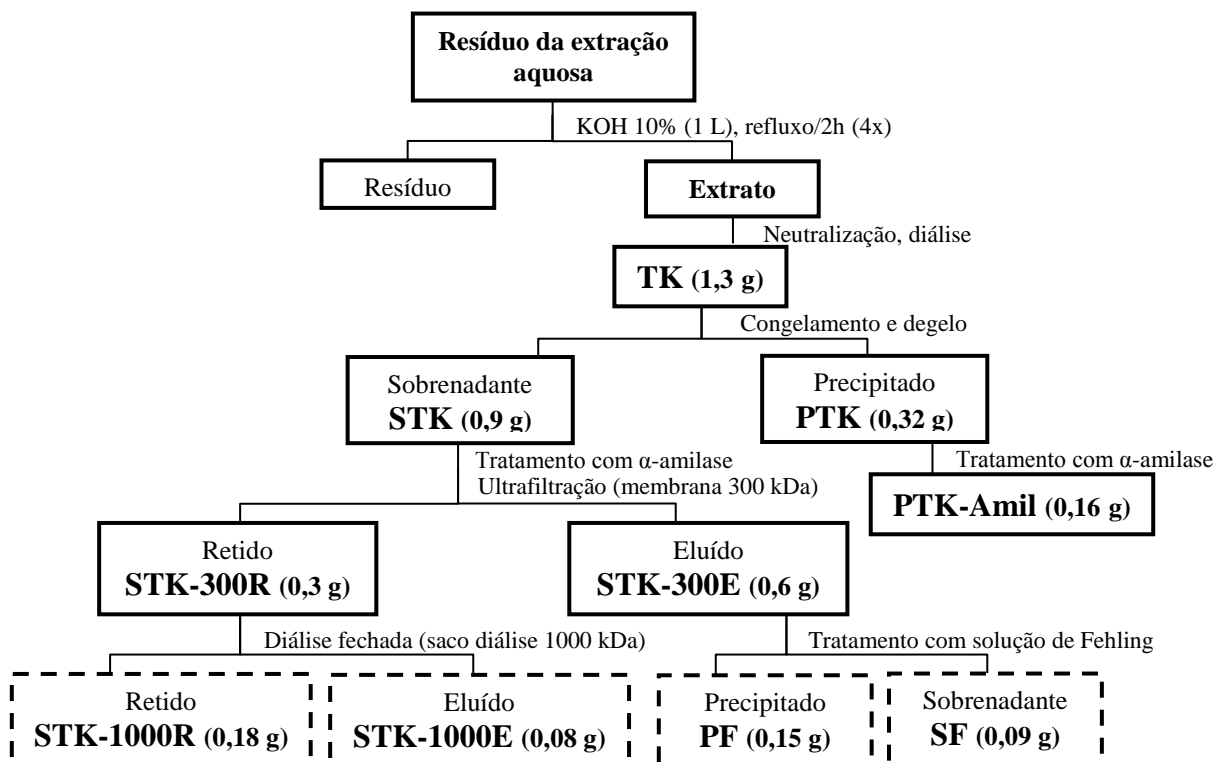


FIGURA 7. ESQUEMA DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA POLPA DO TAMARILLO (*S. betaceum*) POR EXTRAÇÃO ALCALINA

4.4.1 Fracionamento dos polissacarídeos por congelamento e degelo

As frações obtidas das extrações aquosas e alcalinas foram submetidas a este processo de purificação. As frações foram solubilizadas em água destilada, congeladas e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente.

O precipitado, insolúvel em água fria, foi separado por centrifugação (8.000 rpm por 20 min a 15 °C). Esse processo de congelamento e degelo foi repetido várias vezes, até que no sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado e a partir do precipitado, após tentativa de solubilização em água, fosse obtido um sobrenadante límpido. Após essas etapas, os sobrenadantes e precipitados foram reunidos, concentrados e liofilizados (GORIN e IACOMINI, 1984).

4.4.2 Tratamento com α -amilase

As frações de polissacarídeos obtidas após separação por congelamento e degelo em uma concentração de 10 mg/mL, foram tratadas com α -amilase de *Bacillus licheniformis* (SIGMA) para remoção dos teores de amido. A reação ocorreu com 100 unidades/mL de enzima em água, a 37 °C, por 24 h. O acompanhamento da degradação do amido foi realizado pelo teste do lugol. Em seguida as frações foram dialisadas e liofilizadas.

4.4.3 Fracionamento dos polissacarídeos pelo método de Fehling

As frações submetidas ao fracionamento pelo método de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965) foram solubilizadas em pequena quantidade de água e em seguida foi adicionada mesmo volume de uma mistura (1:1) das soluções A (55,7 g sulfato de cobre 5.H₂O.CuSO₄ / H₂O q.s.p. 500 mL) e B de Fehling (125,0 g KOH + 173,0 g tartarato de sódio e potássio / H₂O q.s.p. 500 mL). Em seguida, os materiais foram fortemente agitados e permaneceram por 1 h em geladeira. Os precipitados obtidos foram separados dos sobrenadantes por centrifugação (8.000 rpm por 20 min, a 15 °C).

As frações sobrenadante (SF-STW) e precipitada de Fehling (PF-STW) após neutralização com ácido acético glacial foram dialisadas. Foi observada após esse processo a formação de precipitados no fundo dos sacos de diálise, que foram separados por centrifugação e depois tratados com resina catiônica. As frações sobrenadante e precipitado da fração SF-STW, foram chamadas de SSF e PSF respectivamente; da mesma forma para a fração PF-STW, o sobrenadante e o precipitado chamados de SPF e PPF, respectivamente.

A fração sobrenadante SF (após neutralização com ácido acético glacial e diálise) e o precipitado, fração PF, foram agitados em suspensão aquosa de resina catiônica fortemente ácida para eliminação do cobre residual, e dialisados.

4.4.4 Fracionamento dos polissacarídeos por ultrafiltração e diálise

As frações STW-Amil e STK foram submetidas ao processo de ultrafiltração sendo filtradas em membranas com limites de exclusão de 50 e 300 kDa (Millipore), respectivamente. As ultrafiltrações foram realizadas em um sistema de filtração modelo 16249 (Sartorius), acoplado a um cilindro de ar comprimido. Após cada ultrafiltração duas novas frações foram originadas: uma eluída e outra retida na membrana.

A fração STK-300R foi submetida a diálise em sistema fechado contra água destilada, utilizando membrana com limite de exclusão de 1000 kDa.

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

4.5.1 Composição monossacarídica

A determinação da composição de monossacarídeos neutros foi realizada após hidrólise ácida total de uma alíquota (2 - 3 mg) dos polissacarídeos com TFA 2 M (ácido trifluoracético) por 8 h a 100 °C ou TFA 1 M por 14 h. Decorrido o tempo de hidrólise, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação até secar a temperatura ambiente. O material resultante foi solubilizado em 1 mL de água e submetido a conversão para alditóis a partir da redução com NaBH₄ ou NaBD₄ (especialmente para amostras metiladas) em pH alcalino, por no mínimo 12 h, a temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b).

Após este período, o material foi neutralizado com ácido acético e depois liofilizado. Os derivados alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac₂O) e piridina (1:1, v/v) a 100 °C por 30 min, formando os acetatos de alditóis. O processo foi interrompido com a adição de água e os acetatos de

alditóis extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida com sucessivas lavagens com a solução de sulfato de cobre 5%. Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até secura em temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os acetatos de alditóis produzidos foram analisados por GLC e/ou GC-MS.

4.5.2 Análise de metilação

A metilação dos polissacarídeos foi realizada pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Uma alíquota de 5 mg das frações polissacarídicas foi solubilizada em 1 mL de Me_2SO . Excesso de NaOH triturado e seco foi adicionado à solução, seguido pela adição de 1 mL de CH_3I , agitação em vórtex por 30 min e repouso por 24 h. Esse procedimento foi repetido para garantir a metilação total dos polissacarídeos.

A metilação foi interrompida com água destilada sob banho de gelo e a solução neutralizada com ácido acético. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado diversas vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e o material hidrolisado. A hidrólise das frações metiladas foi realizada conforme a estrutura química do polissacarídeo presente através de dois métodos distintos.

A amostra 50R carboxirreduzida foi submetida à metanólise seguida de hidrólise. Nesse método, o polissacarídeo metilado foi primeiramente pré-hidrolisados com uma solução de ácido clorídrico em metanol a 3,5% (v/v, 2 mL) por 2 h, a 80 °C. O ácido foi neutralizado com a adição de carbonato de prata (Ag_2CO_3) formando desta maneira o cloreto de prata. A amostra foi filtrada e o resíduo lavado com metanol e evaporado até secura em temperatura ambiente. Depois, foi realizada a hidrólise do material com 1,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 M, durante 16 h, a 100 °C. O ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário (BaCO_3). Após centrifugação, o sobrenadante límpido foi reduzido com NaBD_4 e acetilado (item 4.5.1).

No segundo método, as amostras STK-1000R e PF carboxirreduzidas foram submetidas à hidrólise ácida com 0,3 mL de ácido fórmico a 45% (v/v; 0,5 mL) por 16 h, a 100 °C. Após hidrólise, o ácido foi eliminado por evaporação até *secura* em temperatura ambiente, o material solubilizado com 1 mL de água, reduzido com NaBD₄ e acetilado (item 4.5.1).

Os acetatos de alditóis parcialmente metilados formados nos dois métodos foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação obtidos por impacto de elétrons quando comparado com padrões (SASSAKI *et al.*, 2005).

4.5.3 Carboxirredução

O processo de carboxirredução (TAYLOR e CONRAD, 1972) consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH₄. Neste caso, as unidades de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente.

O polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em tampão MES [ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico] (0,2 mol/L, pH 4,75) e depois foi adicionado 24 mg de carbodiimida [ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida], pouco a pouco e sob agitação, para cada 1 mg de ácido urônico contido na amostra. A mistura ficou sob agitação por um total de 2 h. Em seguida, foi ajustado o pH para 7,0 pela adição de tampão TRIS (2 mol/L, pH 7,0) e, posteriormente, a amostra foi reduzida com NaBH₄ para uma concentração final de 2 mol/L. A redução ocorreu *overnight* e foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, a amostra foi dialisada em membranas com limite de exclusão de 8 kDa durante 48 h, concentrada e liofilizada. Todo o processo de carboxirredução foi repetido mais uma vez, para garantir a eficácia do procedimento. Porém, no segundo processo, apenas a metade de carbodiimida foi utilizada.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação quantitativa de ácidos urônicos foi efetuada segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Foi utilizado 0,4 mL de amostra e adicionado 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L (pH 1,6). Em seguida, foram adicionados 2,4 mL de tetraborato de sódio (75 mmol/L em ácido sulfúrico). A solução foi agitada em vórtex e aquecida em banho-maria fervente por 20 min. Após resfriar os tubos até a temperatura ambiente (em banho de gelo), foi adicionado 80 µL de meta-hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v) e os tubos foram novamente agitados em vórtex. A presença de ácidos urônicos foi visualizada pelo aparecimento de uma coloração rósea. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico (em 0,4 mL de amostra), com leitura em 525 nm. O ácido galacturônico foi utilizado como padrão.

4.6.2. Determinação da homogeneidade e massa molar

Os ensaios de homogeneidade e determinação de massa molar foram realizados em HPSEC, através do aparelho da Wyatt Technology, equipado com um cromatógrafo de exclusão estérica de alta *performance* (HPSEC), com quatro colunas *ultrahydrogel* 2000, 500, 250 e 120 acopladas em série (com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 , respectivamente) e um detector de índice de refração, modelo Waters 2410. Como eluente, foi usada uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 0,2 g/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min. As amostras foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 M para uma concentração final de 1 mg/mL e filtradas em membranas de éster de celulose (MILLIPORE), de porosidade 0,22 µm.

Para o cálculo da massa molar (M_w), as amostras com perfil de eluição homogêneo tiveram seu valor de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinado, já que este valor é específico para cada amostra. Para tanto, a amostra foi solubilizada na solução usada como eluente, para uma concentração final de 1 mg/mL, e filtrada através de membrana de éster de celulose (MILLIPORE), de porosidade 0,22 μm . A amostra foi diluída para as concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL. Os resultados de homogeneidade e de determinação de massa molar foram analisados com o *software* ASTRA 4.70.07.

4.6.3 Cromatografia de camada delgada (TLC)

A análise de cromatografia em camada delgada (TLC - *Thin Layer Chromatography*) foi realizada em placa de sílica gel 60G (MERCK) com 10 cm de altura total. Foi utilizado como fase móvel uma mistura de acetato de etila:ácido acético:*n*-propanol:água (4:2:2:1, v/v) e como revelador orcinol:H₂SO₄ (0,2 g de orcinol, em 95 mL de etanol e 5 mL de H₂SO₄) (SASSAKI *et al.*, 2008).

4.6.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A análise de GC-MS foi realizada utilizando-se um cromatógrafo a gás Varian Sarturn 2000R - modelo 3.800 acoplado a um espectrômetro de massa de marca Varian Ion – Trap 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida DB – 225 (30 m x 0,25 mm). Hélio ultrapuro foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se de 50 °C (mantida por 1 min), seguindo-se de um aumento gradual de 40 °C/min até 210 °C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados) e mantido por 30 minutos ou até 230 °C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente por 20 minutos.

4.6.5 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN- ^{13}C , DEPT-135 e os bidimensionais HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*) e COSY (*Correlation Spectroscopy*) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III (Bruker; Karlsruhe, Alemanha), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, observando-se os núcleos de ^1H e ^{13}C a 400,13 e 100,62 MHz, respectivamente.

As amostras foram analisadas em uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro, às temperaturas de 50 °C ou 70 °C, utilizando como solventes D_2O ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, de acordo com a solubilidade dos polissacarídeos. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, e foram utilizados como padrão interno os sinais de acetona (δ 30,2) ou $\text{DMSO}-d_6$ (δ 39,7). Os espectros foram processados com o auxílio do programa TopSpin (Bruker; Karlsruhe, Alemanha).

4.6.6 Determinação do grau de *O*-metil esterificação por RMN- ^1H

O grau de esterificação da pectina STW-Amil foi determinado utilizando o método de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H), segundo a metodologia de Grasdalen; Bakøi e Larsen (1988). Para diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado ao oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro, a amostra (5 mg) foi dissolvida em D_2O , congelada e liofilizada, sendo esse processo repetido por 3 vezes. A amostra foi solubilizada em D_2O e analisadas em uma sonda invertida de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos a 80 °C (256 scans). Os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram expressos em relação à ressonância do deutério, em 4,20 ppm.

A quantificação de DE foi realizada empregando-se a seguinte equação:

$$\text{DE (\%)} = \frac{\text{IA} - \text{IB}}{\text{IA} + \text{IB}} \times 100$$

Onde IA é referente a intensidades das ressonâncias de H1 de GalA esterificadas e livres e de H5 de unidades de GalA esterificadas, e IB é referente a intensidades das ressonâncias de H5 de unidades de GalA livres.

4.6.7 Determinação do grau de *O*-acetil esterificação por espectrofotometria

A dosagem de acetil foi efetuada de acordo com Hestrin (1949). O método se baseia na habilidade que grupamentos ésteres têm de reagir quantitativamente com hidroxilamida em solução alcalina. O ácido acetohidroxâmico proveniente dos grupos acetil, reage quantitativamente com cloreto férrico (FeCl_3) produzindo um complexo solúvel laranja-amarronzado.

Primeiramente, foi utilizado 0,5 mL de amostra (1 mg/mL) e adicionado 1 mL de uma solução de hidroxilamina 2 M e hidróxido de sódio 3,5 N (1:1). Em seguida adicionou-se uma solução de 0,5 mL de HCl em água (1:3) e 0,5 mL de uma solução de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,37 M em HCl 0,1 N.

Os ensaios foram realizados em triplicata e como padrão foram utilizadas soluções de β -D-galactose pentaacetato nas concentrações de 0,1 – 0,8 mg/mL e leitura em 540 nm. A sensibilidade do método é de 0,04 a 5 nM de ester/mL.

4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com as professoras Maria Fernanda de Paula Werner e Cristiane Hatsuko Baggio do Departamento Farmacologia da Universidade Federal do Paraná.

4.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus*, variedade Swiss (25-35g), fêmeas, mantidos em sala climatizada (22 ± 2 °C) e umidade controlada, com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e acondicionados no laboratório por no mínimo 1 h antes da realização dos testes e utilizados uma única vez para os experimentos.

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) sob o número 613 e foram desenvolvidos de acordo com as diretrizes sobre cuidados com animais utilizados em laboratório (“*Principles of Laboratory Animal Care*” - NIH Publication 85-23, revisado 1985) e sobre ética em experimentos que causem dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e intensidade dos estímulos dolorosos utilizados foi o mínimo necessário para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos testados.

4.7.2 Avaliação da atividade antinociceptiva de polissacarídeos no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de 0,45 mL de ácido acético 0,6% (diluído em solução salina, NaCl 0,9%), o qual promoveu contorções abdominais, que consistiram na contorção da musculatura abdominal, juntamente com a extensão das patas posteriores. Os animais foram ambientados individualmente em funis de vidro transparentes para aclimação por 30 min. Em seguida, grupos de animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal com a fração STK-1000R, nas doses de 0,01 a 10 mg/kg, 60 min antes da injeção do ácido acético.

Os grupos experimentais foram divididos em: a) controle não tratado (veículo, 0,1 mL/10 g, i.p.) + ácido acético 0,6% (450 µL/i.p.); b) STK-1000R (0,01 mg/kg, i.p.)

+ ácido acético 0,6% (450 µL/i.p. e i.p.); c) STK-1000R (0,1 mg/kg, i.p.) + ácido acético 0,6% (450 µL/i.p.); d) STK-1000R (1,0 mg/kg, i.p.) + ácido acético 0,6% (450 µL/i.p.); e) STK-1000R (10,0 mg/kg, i.p.) + ácido acético 0,6% (450 µL/i.p.).

Imediatamente após a injeção do ácido acético, os animais foram recolocados nos funis de vidro e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min (RODRIGUES *et al.*, 2012). Após a contagem das contorções abdominais, os animais foram sacrificados com tiopental (100 mg/kg, i.p.).

4.7.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

Os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e mantidos por um período de 30 min para aclimação, seguindo a metodologia de Rodrigues e colaboradores (2012). Em seguida, grupos de camundongos foram tratados pela via intraperitonal com a fração polissacarídica (doses de 0,01 a 1 mg/kg, i.p.), 60 min antes da injeção de 20 µL de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. Após a injeção da formalina, os camundongos foram recolocados individualmente nos funis de vidro em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (FASE I) e 15-30 min (FASE II). O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado e considerado como indicativo de nocicepção. Dessa maneira, foram utilizados os grupos de animais: a) controle não tratado (veículo, 0,1 mL/10 g, i.p.) + formalina 2,5% (20 µL/pata); b) STK-1000R (0,01 mg/kg, i.p.) + formalina 2,5% (20 µL/pata); c) STK-1000R (0,1 mg/kg, i.p.) + formalina 2,5% (20 µL/pata); d) STK-1000R (1,0 mg/kg, i.p.) + formalina 2,5% (20 µL/pata).

4.7.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, exceto os valores de DI_{50} (doses das frações testadas que reduzirem as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI_{50} foram determinados por regressão não-linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. Para os dados paramétricos, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente as cascas e sementes do tamarillo (*Solanum betaceum*) foram retirados obtendo-se cerca de 1,2 kg de polpa. A polpa foi então liofilizada, sendo o teor de umidade presente de aproximadamente 80%. Partindo-se do total do material seco e moído (235 g), foi realizada a deslipidificação, em aparelho de Soxhlet (clorofórmio-metanol, 1:1 v/v), resultando em um rendimento de 26% de compostos apolares.

5.1 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO AQUOSA

O esquema das etapas de extração e de purificação realizados e as frações obtidas nesta fase estão representados na figura 6, p. 43.

O material deslipidificado (173 g) foi submetido a sete extrações aquosas sequenciais, sob refluxo. Os extratos obtidos foram reunidos, concentrados em rotaevaporador e submetidos à precipitação com etanol (3:1) para separação dos componentes de alta massa molar, obtendo-se a fração polissacarídica TW (20,4 g, 11,8% em relação a polpa deslipidificada) (FIGURA 8).

O rendimento e a composição monossacarídica de cada fração obtida durante o processo de purificação estão apresentados na tabela 1. O cálculo dos rendimentos foi relacionado ao total de polpa deslipidificada obtida.

A análise da composição monossacarídica mostrou que a fração TW é constituída principalmente pelos monossacarídeos arabinose, manose, galactose e glucose, sendo que o teor de ácido urônico não foi determinado.



FIGURA 8. PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA DO EXTRATO AQUOSO DA POLPA DO TAMARILLO (*S. betaceum*)

TABELA 1. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (*S. betaceum*)

Frações	⁽¹⁾ Rendimento		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ac. Uron.
	(g)	%								
TW	20,4	11,8	1,2	4,5	31,1	-	12,7	7,9	42,6	ND
PTW	1,3	0,75	-	-	32,0	-	-	-	68,0	-
PTW-Amil	0,3	0,17	-	-	100,0	-	-	-	-	-
STW	14,0	8,0	2,9	-	22,0	6,1	3,4	19,8	16,4	29,4
STW-Amil	8,8	5,1	1,9	-	29,6	5,8	-	28,5	3,8	30,4
PPF	5,5	3,0	0,6	-	17,2	3,4	-	10,8	-	68,0
PSF	0,7	0,4	1,4	-	39,5	0,7	-	21,3	2,1	35,0
SSF	0,3	0,17	-	-	33,4	9,6	-	33,8	5,2	18,0
SPF	0,16	0,09	2,1	-	13,7	5,0	4,3	38,0	5,9	31,0
50E	0,28	0,16	-	-	33,1	12,2	2,7	38,3	7,7	6,0
50R	0,17	0,1	2,5	-	47,1	10,7	-	25,7	-	14,0

Notas: Análise dos acetatos de alditóis por GLC e/ou GC-MS. (1) partindo de 173 g de polpa deslipidificada; (2) determinação de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác. Uron. (ácido urônico); ND – não determinado.

Como primeira etapa de purificação, TW foi submetida ao processo de congelamento e degelo, gerando após esta etapa uma fração insolúvel (PTW) e uma fração solúvel em água fria (STW).

5.1.1 Purificação e caracterização estrutural: arabinana linear

A fração PTW apresentou, na análise de composição monossacarídica, principalmente arabinose (32,0%) e glucose (68,0%) (TABELA 1). A alta concentração de glucose sugeriu a presença de amido na fração. Isto foi confirmado pelo espectro de RMN- ^{13}C desta fração, o qual apresentou sinais intensos e característicos de amilose em δ 100,1 (C1), 78,9 (C4 substituído), 73,3 (C3), 72,1 (C2) e 71,7 (C5) e 60,7 (C6). Ainda, o sinal em 70,3 ppm indica a presença de C6 substituído, proveniente das unidades de glucose que formam o ponto de ramificação da amilopectina (FALK e STANEK, 1997). O sinal em 108,1 ppm foi atribuído ao C1 de unidades de arabinose (FIGURA 9A).

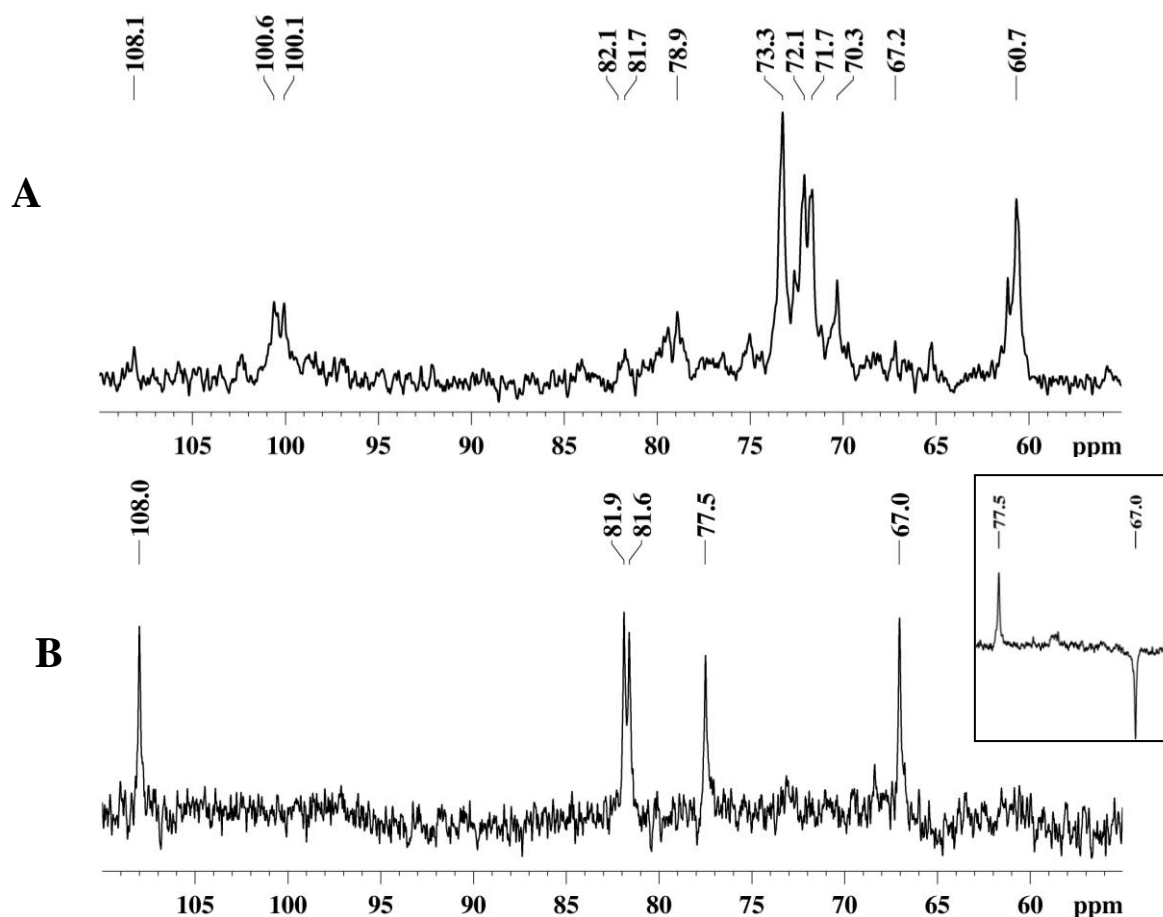


FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO PTW (A) E DA ARABINANA LINEAR PRESENTE NA FRAÇÃO PTW-AMIL (B). Experimento realizado em $\text{DMSO}-d_6$, a 70°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm. No inserto em (B) pode-se observar o experimento DEPT-135 da fração PTW-Amil

Desse modo, a fração PTW, foi tratada com α -amilase para remoção do amido, resultando na fração PTW-Amil (FIGURA 6, p. 43). Após este tratamento, a análise da composição monossacarídica revelou que a fração PTW-Amil passou a ser constituída unicamente por arabinose. O espectro de RMN- ^{13}C de PTW-Amil demonstrou o desaparecimento dos sinais referentes ao amido, e a presença de cinco sinais intensos referentes à arabinose (FIGURA 9B), indicando a presença de unidades de α -L-Araf substituídas em O-5, sugerindo que a fração é constituída por uma arabinana linear (1 \rightarrow 5) ligada (SWAMY e SALIMATH, 1991; THUDE e CLASSEN, 2005; CORDEIRO *et al.*, 2012).

Os assinalamentos foram realizados por experimento de COSY e HSQC, sendo atribuídos os sinais em 108,0/4,88 ppm ao C1/H1 e em 81,9/3,98, 81,7/3,93, 77,4/3,79 e 67,0/3,74/3,65 ppm atribuídos a C4/H4, C2/H2, C3/H3 e C5/H5/H5' de unidades de α -L-Araf (1 \rightarrow 5) ligadas, respectivamente (FIGURA 10). O C5 substituído foi confirmado pelo experimento de DEPT-135 (inserto FIGURA 9B), o qual demonstrou uma inversão de sinal do CH₂ em 67,0 ppm.

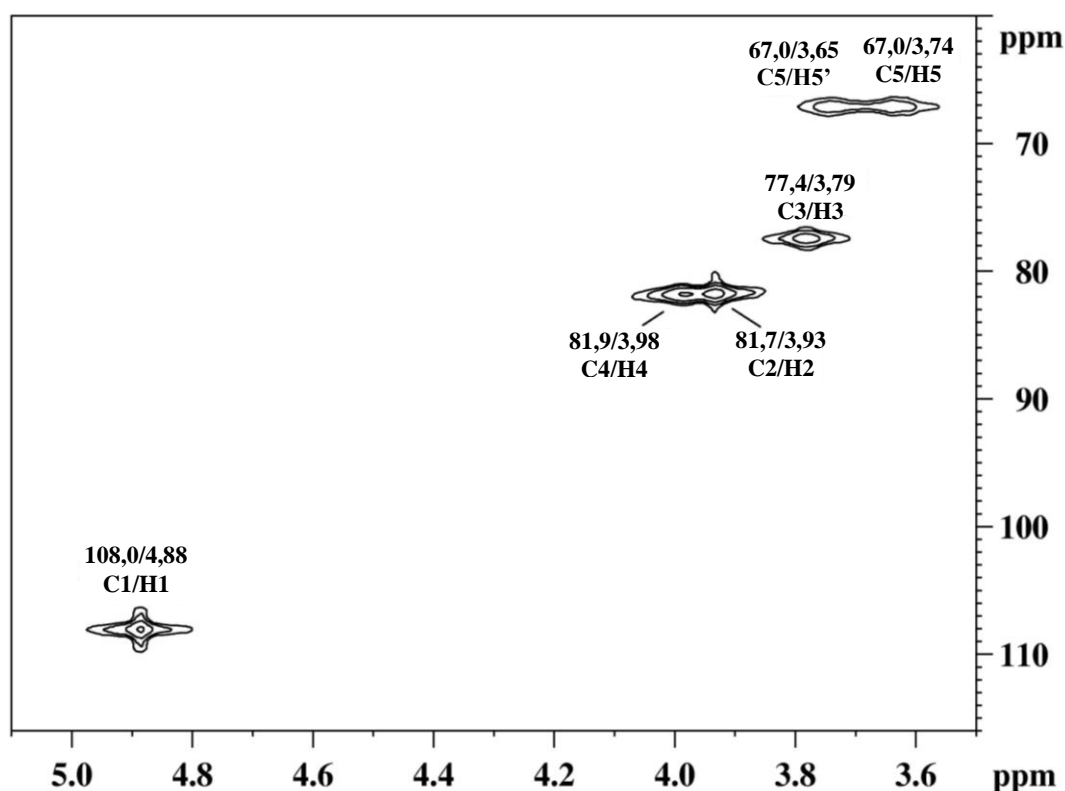


FIGURA 10. ESPECTRO DE HSQC DA ARABINANA LINEAR PRESENTE NA FRAÇÃO PTW-AMIL. Experimento realizado em DMSO- d_6 , a 70 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

As arabinanas são encontradas na parede celular primária de diversas partes de plantas de diferentes famílias, como em sementes, frutas, cascas de caules e em raízes (NAVARRO, CEREZO e STORTZ, 2002). Usualmente as arabinanas presentes na literatura possuem a cadeia principal constituída por unidades de arabinose (1→5) ligadas, podendo ser ramificadas somente em *O*-3, como o encontrado no suco de uva (VILLETZAZ, AMADO e NEUKOM, 1981), na semente de quinoa (CORDEIRO *et al.*, 2012), no bagaço de azeitona (CARDOSO, SILVA e COIMBRA, 2002) e em raízes de *Echinacea pallida* (THUDE e CLASSEN, 2005), ou ainda altamente ramificadas em *O*-2 e *O*-3, como as arabinanas encontradas em sementes da leguminosa *Cajanus cajan* (SWAMY e SALIMATH, 1991), de espinheiro da Virgínia (*Gleditsia triacanthos*) (NAVARRO, CEREZO e STORTZ, 2002), do cacto *Opuntia ficus-indica* (HABIBI, MAHROUZ e VIGNON, 2005) e de *Caesalpinia bonduc* (MANDAL *et al.*, 2011), além das arabinanas presentes na leguminosa *Vigna sinensis* (MURALIKRISHNA e THARANATHAN, 1986), no repolho (STEVENS e SELVENDRAN, 1980), nos grãos de soja (ASPINALL e COTTRELL, 1971) e na amêndoa (DOURADO *et al.*, 2006).

Arabinanas lineares (1→5) ligadas, como a encontrada nesse estudo, foram descritas apenas em suco de maçã (CHURMS *et al.*, 1983) e em sementes de *Schizolobium parahybae*, *Cassia fastuosa* (PETKOWICZ *et al.*, 1998) e de quinoa (CORDEIRO *et al.*, 2012).

5.1.2 Purificação e caracterização estrutural: frações pécticas

Como mencionado anteriormente, a fração TW foi submetida ao processo de congelamento e degelo, gerando uma fração solúvel em água fria (STW) (FIGURA 6, p. 43). Esta fração apresenta predominantemente arabinose (22%), galactose (19,8%), glucose (16,4%) e de ácido urônico (29,4%) em sua composição monossacarídica (TABELA 1), e perfil de eluição heterogêneo mostrado por HPSEC (FIGURA 11).

Devido ao teor de glucose, a fração STW também foi submetida ao tratamento com α -amilase, gerando a fração STW-Amil. Assim como para a fração PTW-Amil, essa etapa de purificação foi efetiva para redução do teor de glucose, que diminuiu de 16,4% para 3,8%. O perfil de eluição em HPSEC da fração ainda permaneceu heterogêneo após o tratamento com a enzima, porém com desaparecimento do pico em torno de 60 min provavelmente pertencente ao amido (FIGURA 11). Em relação à composição monossacarídica a fração STW-Amil apresentou principalmente arabinose (29,6%), galactose (28,5%) e de ácido urônico (30,4%) (TABELA 1).

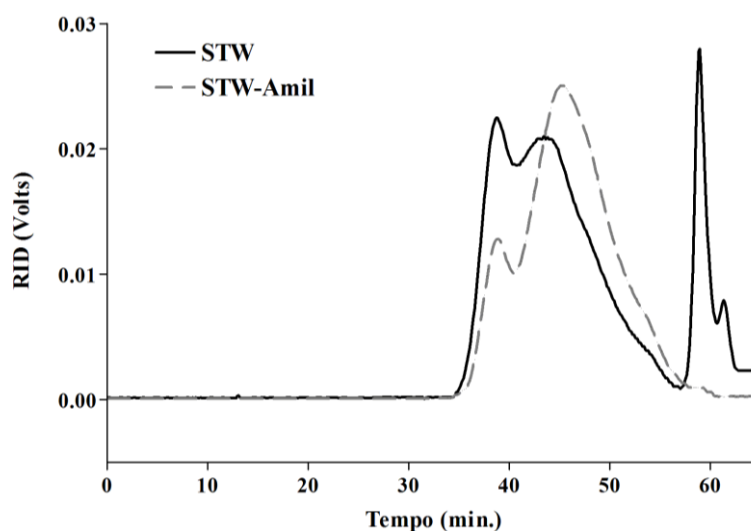


FIGURA 11. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STW E STW-AMIL

Com o objetivo de confirmar a identidade do ácido urônico presente na fração, uma alíquota da amostra foi carboxirreduzida e analisada por GC-MS. Neste procedimento, o ácido urônico é transformado no seu açúcar neutro correspondente. Desse modo, o aumento da percentagem de galactose na fração carboxirreduzida indicou que o ácido urônico na fração STW-Amil é representado pelo ácido galacturônico.

O espectro de RMN- ^{13}C da fração STW-Amil está mostrado na figura 12. Os assinalamentos realizados mostram sinais referentes à região anomérica em 107,5 e 104,4 ppm, atribuídos respectivamente às unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1999; CORDEIRO, 2012) e de β -D-Galp (TISCHER; GORIN e IACOMINI, 2002;

CIPRIANI, *et al.* 2009), além dos sinais em 100,2 e 99,4 ppm correspondentes ao C1 de unidades de α -D-GalpA metil-esterificadas e livres, respectivamente. Os sinais em 77,6, 74,5, 73,4, 71,9 e 60,8 ppm podem ser atribuídos a C4 substituído, C5, C3, C2 e C6, respectivamente, de unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas (BOCK e PEDERSEN, 1983; PETERSEN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010). Os sinais em 52,8 e 170,8 ppm foram atribuídos ao grupo metoxil ($-\text{COOCH}_3$) e ao grupo carboxila ($-\text{COOH}$) de unidades de GalpA metil-esterificadas, respectivamente. Os demais carbonos do anel das unidades de GalpA foram identificados em 78,8 (C4 substituído), 70,5 (C5) e 67,9 (C2 e C3 sobrepostos) (PETERSEN *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009).

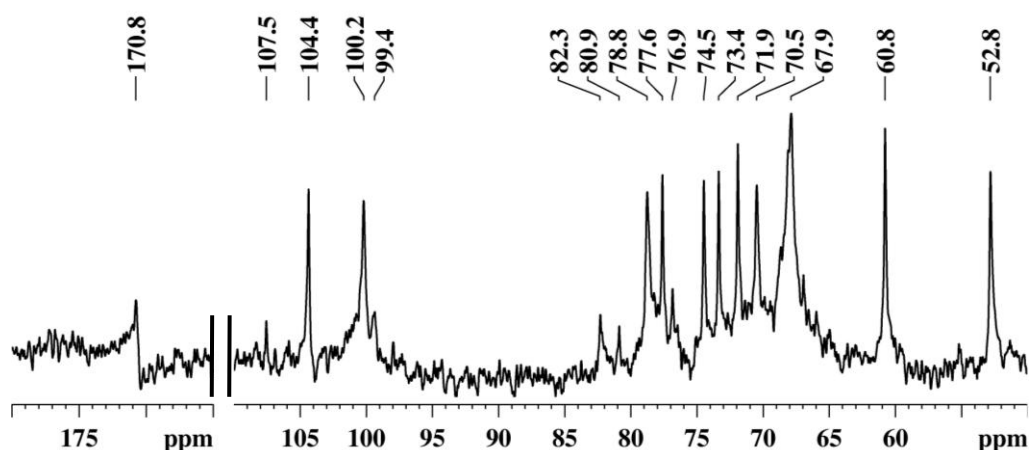


FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO STW-AMIL. Experimento realizado em D_2O , a 50 °C, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

A análise de RMN- ^{13}C demonstra, desta maneira, a presença de uma fração pética constituída, provavelmente, por uma mistura de homogalacturonana (HG) metil-esterificada e de uma arabinogalactana tipo I (AG-I) na fração STW-Amil.

Devido a presença de unidades de α -D-GalpA metil-esterificadas, o grau de esterificação (DE) foi determinada por espectrometria de RMN- ^1H , segundo a metodologia de Grasdalen; Bakøi e Larsen (1988) (FIGURA 13). Dentre os cinco sinais observados na região em campo baixo indicada por A, os três primeiros (1-3) são atribuídos ao H1 de unidades de GalpA esterificadas e livres e os outros dois picos (4 e 5) ao H5 de unidades de GalpA esterificadas. O sinal indicado com o número 4

predomina em valores de DE altos e deve ser oriundo de uma unidade esterificada vizinha de outra também esterificada, enquanto há um predomínio do pico 5 em pectinas com DE baixo. Na região indicada por B, os três sinais (6-8) são atribuídos a H5 de unidades de GalpA livres. Quantitativamente, os valores de DE estão relacionados às intensidades (I) das ressonâncias em A e B pela relação mostrada na equação abaixo (GRASDALEN, BAKØI e LARSEN, 1988).

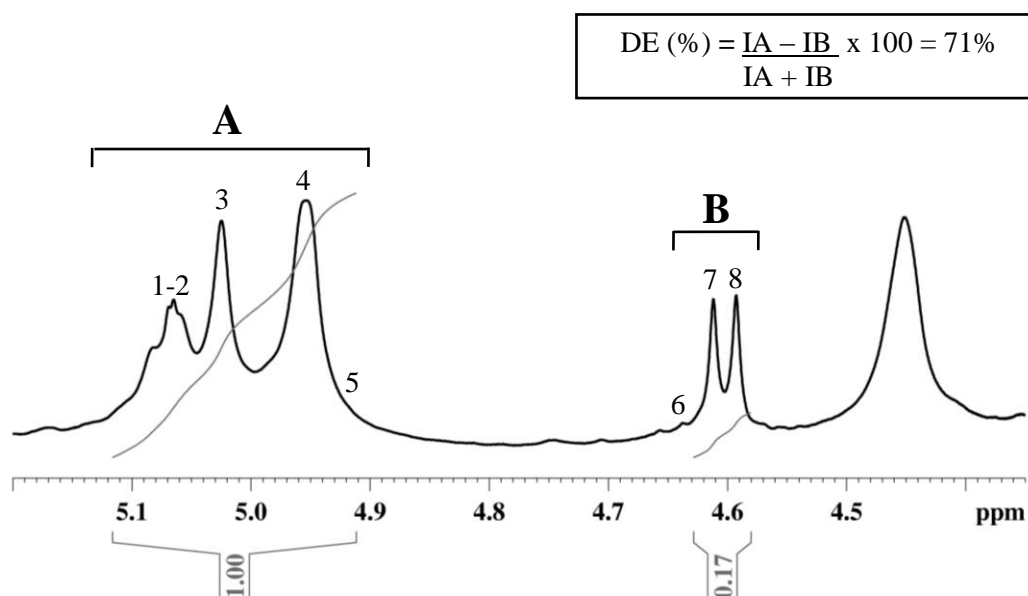


FIGURA 13. REGIÃO DE CAMPO BAIXO DO ESPECTRO DE RMN-¹H DAS FRAÇÕES STAW-AMIL UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE METIL-ESTERIFICAÇÃO (DE). Experimento realizado em D₂O, a 80 °C, 256 scans, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Os resultados demonstram que a fração STW-Amil apresenta 71% das unidades de GalpA metil-esterificadas, indicando tratar-se de uma homogalacturonana com alto grau de metil-esterificação (HM). De acordo com Rolin (1993), os mecanismos de geleificação são diferentes para pectinas de alto teor de esterificação (HM) e de baixo teor de esterificação (LM). Pectinas HM formam géis mais fortes, fator importante para a indústria de alimentos, visto que o processamento de frutas na fabricação de geléias, nesse caso, requer baixo pH e altas concentrações de sacarose.

Frutas consideradas boas para a produção de compotas e geléias, ou seja, que facilmente formam géis possuem conteúdos de metil-esterificação semelhantes ao

encontrado na fração STW-Amil, como o caso da goiaba (71%), do morango (72%), da maçã (75%) e da jabuticaba (71%) (LIMA *et al.*, 2010).

O grau de acetil-esterificação (DA) também foi mensurado para a fração STW-Amil. A dosagem foi realizada de acordo com Hestrin (1949) e apresentou um conteúdo de acetil de 1,3%. O grau de acetilação é um parâmetro importante quando se considera a capacidade de geleificação das pectinas, uma vez que polímeros com DA de 12,5% ou superior não formam géis (VORAGEN *et al.*, 1995).

Na tentativa de separar os polissacarídeos, a fração STW-Amil foi submetida ao processo de precipitação com solução de Fehling (FIGURA 6, p. 43). Uma vez que é conhecido que arabinogalactanas permanecem solúveis após este tratamento, enquanto as HG, devido a presença de hidroxilas vicinais, se complexam com o cobre e precipitam (CAPEK, 2008). Nesse processo foram obtidas quatro frações, como descrito no item 4.4.3 da seção de materiais e métodos.

O método mostrou-se efetivo para separar os polissacarídeos. As homogalacturonanas presentes nas frações formaram um complexo com o cobre e precipitaram, gerando as frações PPF e PSF, enquanto as arabinogalactanas permaneceram solúveis no sobrenadante, resultando nas frações SSF e SPF, como verificado na comparação entre os espectros de RMN-¹³C dessas frações (FIGURA 14 e FIGURA 16).

A composição monossacarídica da fração PPF apresenta como principal constituinte o ácido urônico (68%), seguido pelos monossacarídeos neutros arabinose, galactose, xilose. Já a fração PSF possui os mesmos monossacarídeos, porém com menor conteúdo de ácidos urônicos (35%) (TABELA 1, p. 57). O maior conteúdo de arabinose e galactose, e menor conteúdo de ácido urônico da fração PSF em relação a fração PPF pode explicar as diferenças de solubilidade dessas frações antes da diálise, ficando a fração PSF insolúvel apenas após este processo já que seu conteúdo de ácido urônico é maior que o encontrado na fração SSF..

A análise de HPSEC demonstra que os polissacarídeos das frações PPF e PSF continuam heterogêneos (FIGURA 15). Pectinas puras são dificilmente obtidas de materiais vegetais, devido sua natureza heterogênea, pois apresentam regiões lineares e

cadeias laterais ramificadas, variações inter e intramolecular, além de diferentes padrões de distribuição dos grupos metil-ésteres ao longo da cadeia poligalacturônica.

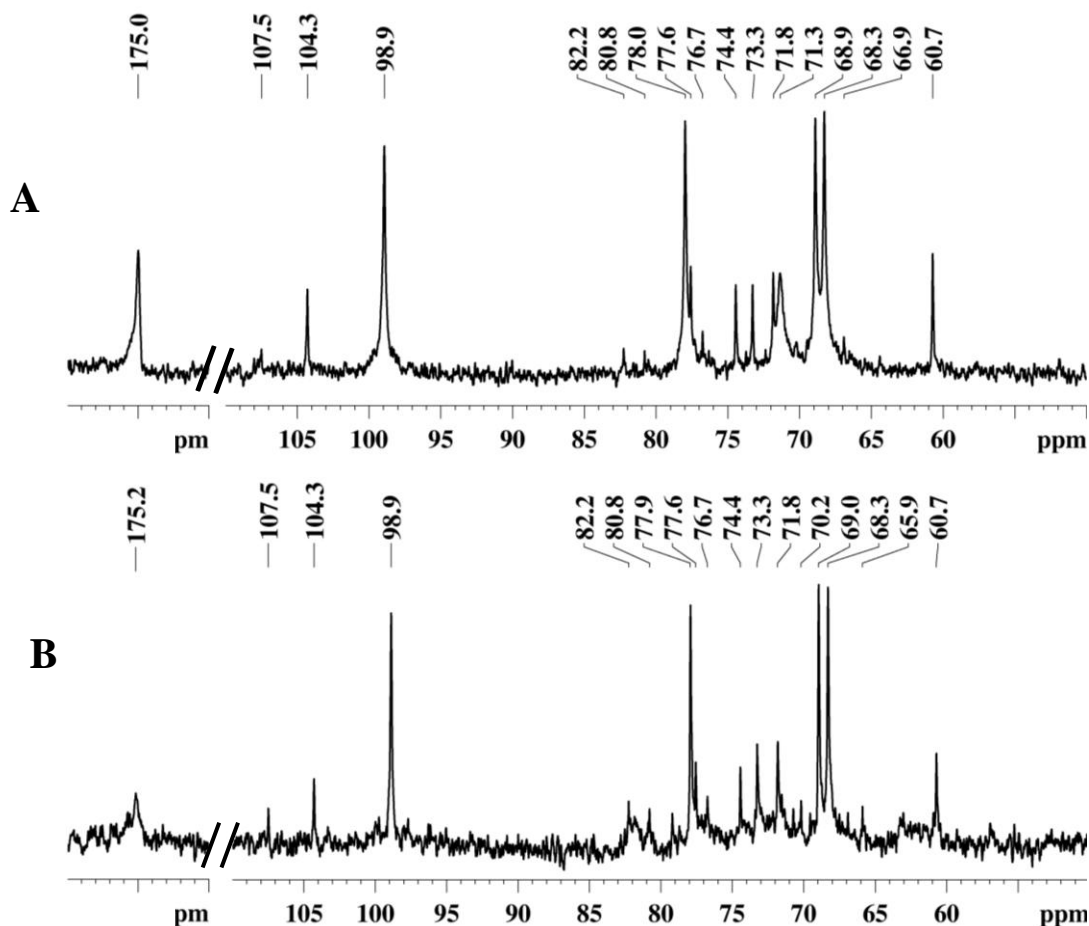


FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES PPF (A) E PSF (B). Experimentos realizados em D_2O , a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Como visto na figura 14, ambas as frações apresentam espectros de RMN- ^{13}C bastantes similares, indicando a presença de pectinas com estruturas químicas semelhantes, mas com massas molares diferentes.

A presença da homogalacturonana na fração PPF foi evidenciado na análise do espectro de RMN- ^{13}C (FIGURA 14A) pela presença na região anomérica do sinal intenso em 98,9 ppm referente a unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$ não esterificadas. Além dos sinais na região do anel em 175,0, 78,0, 71,3, 68,9, 68,3 ppm atribuídos ao C6 ($-\text{CO}_2\text{H}$), C4 substituído, C5, C3 e C2 das unidades de $\alpha\text{-D-GalpA}$ (1 \rightarrow 4)-ligadas, respectivamente. Nota-se que houve um deslocamento dos sinais referentes às

unidades de GalA, além do desaparecimento do sinal em 52,8 ppm referente ao grupo metoxil ($-\text{COOCH}_3$), no espectro de RMN- ^{13}C , após o tratamento com a solução de Fehling em relação a fração STW-Amil (FIGURA 12). Esta mudança deve-se a desesterificação das unidades de GalA em meio alcalino. A fração PPF apresentou ainda, sinais compatíveis com uma AG-I em 104,3 (C1), 77,6 (C4), 74,4 (C5), 73,3 (C3), 71,8 (C2) e 60,7 (C6) ppm referentes às unidades de β -D-Gal (1 \rightarrow 4) ligada e em 107,5 ppm atribuído ao C1 de unidades de L-Araf (PETERSEN *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009).

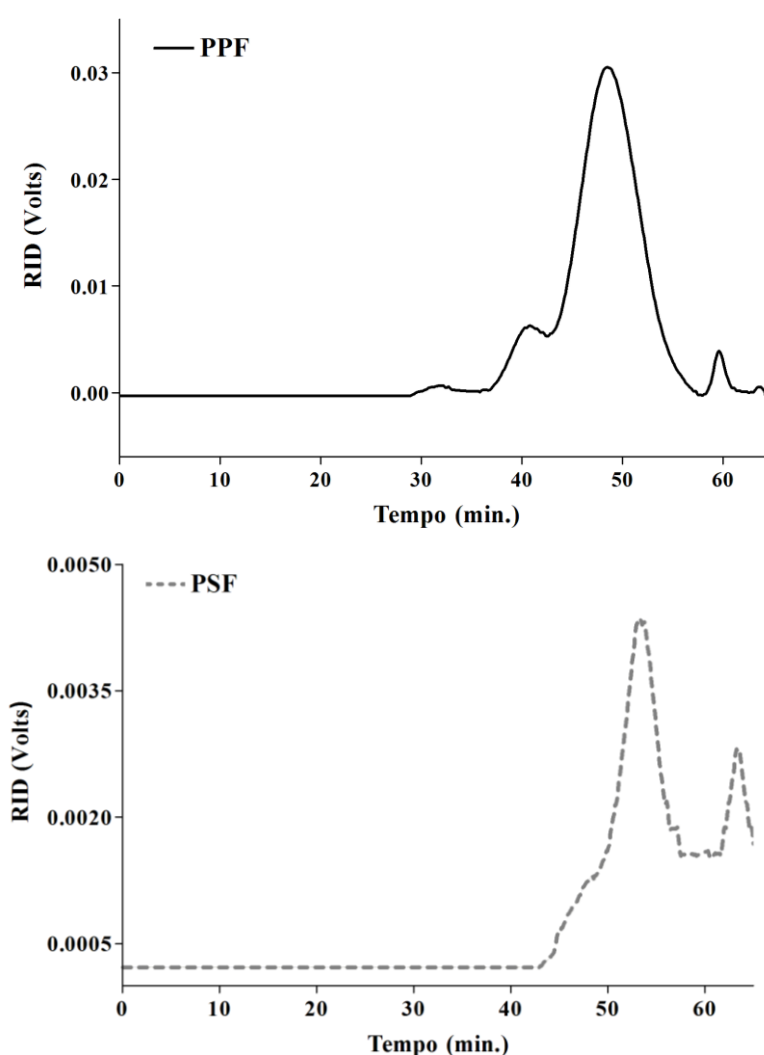


FIGURA 15. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES PPF E PSF

A composição da amostra PPF carboxirreduzida apresentou um aumento do conteúdo de galactose para 67%, um aumento de cerca 6x em relação à fração nativa, confirmando a presença de ácido galacturônico em sua estrutura, como é esperado para pectinas. Houve também, um pequeno aumento nos percentuais dos outros monossacarídeos neutros Rha:Ara:Xyl:Glc para 3:20:7:6, respectivamente.

Todos estes dados sugerem que a fração PPF possa ser constituída por uma mistura de polissacarídeos, provavelmente homogalacturonanas e AG-I, ou ainda, que esses polissacarídeos façam parte de uma mesma estrutura péctica, por exemplo, uma homogalacturonana com pequenas inserções de ramnogalacturonanas do tipo I, ramificadas por AG-I.

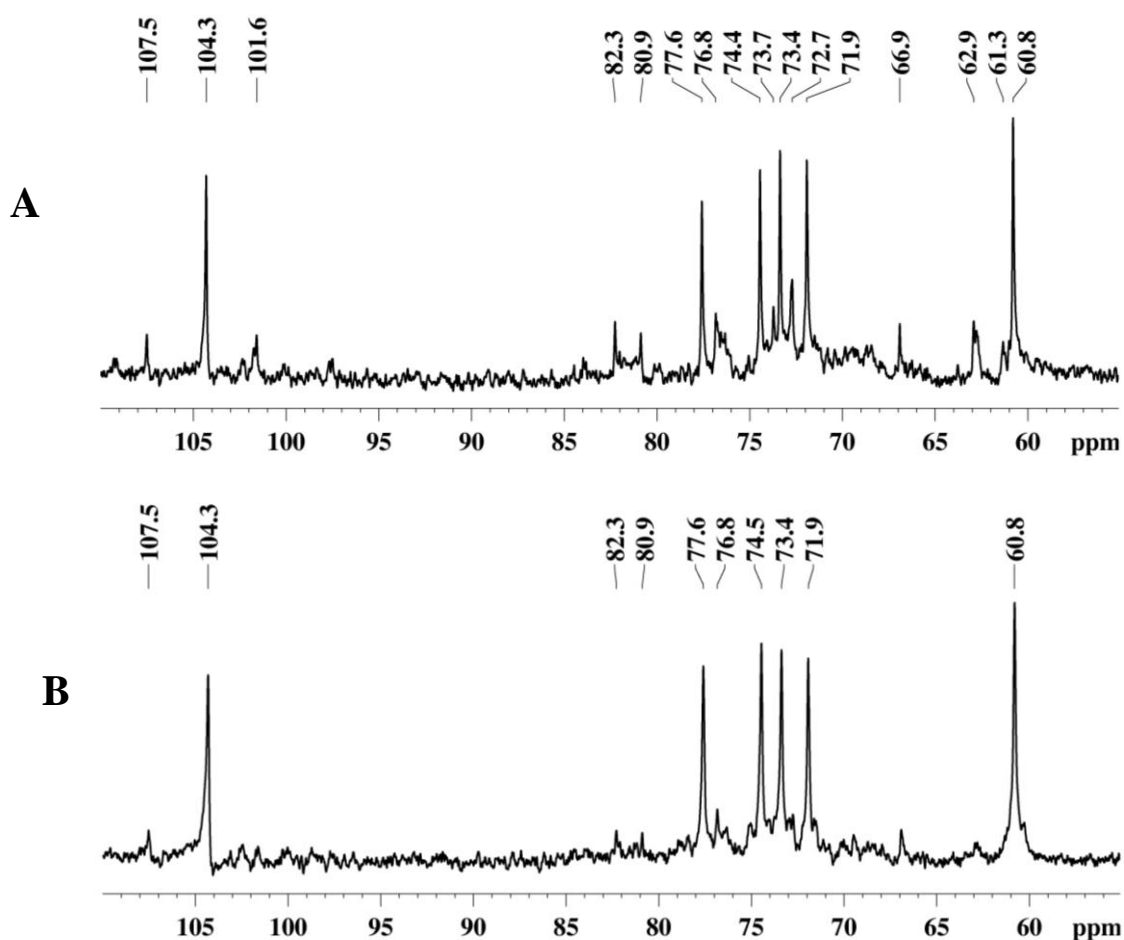


FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES SSF (A) E SPF (B). Experimentos realizados em D_2O , a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Assim como, as frações PPF e PSF as frações SSF e SPF apresentam espectros de RMN-¹³C bastante similares (FIGURA 16). Porém, estas frações possuem arabinose e galactose como constituintes majoritários, indicando provavelmente a presença de arabinogalactanas (TABELA 1, p.57).

A comparação da composição monossacarídica entre ambas as frações revelou que SSF tem maior conteúdo de arabinose e menos ácido urônico que SPF. Portanto o maior conteúdo de ácido urônico pode explicar a razão pelo qual a fração SPF foi precipitada pela solução de Fehling.

Quando analisado o perfil de eluição em HPSEC das frações SSF e SPF, observou-se que ambas as frações demonstraram a presença de dois picos eluindo entre 45 e 55 minutos (FIGURA 17). A análise dos espectros de RMN-¹³C mostrou a presença de seis sinais mais intensos referentes a unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas em 104,3 (C1) ppm e em 77,6 (C4), 74,4 (C5), 73,4 (C3), 71,9 (C2) e 60,8 (C6) ppm. Além do sinal referente a unidades de α -L-Araf na região do carbono anômérico em 107,5 ppm, sugerindo a presença de uma arabinogalactana tipo I (FIGURA 16) (BOCK e PEDERSEN, 1983; PETERSEN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010).

Devido às semelhanças estruturais observadas nos espectros de RMN-¹³C, e perfis de eluição em HPSEC idênticos, as frações acima foram reunidas e purificadas por ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 50 kDa (FIGURA 6, p. 43). Esta estratégia foi altamente eficiente e rendeu uma fração eluída (50E), com perfil heterogêneo, e outra retida na membrana (50R), com perfil de eluição homogêneo, como observado na figura 17.

As frações 50E e 50R apresentaram como principais monossacarídeos arabinose, galactose e xilose (TABELA 1, p. 57). O alto conteúdo de arabinose e galactose sugerem a presença de arabinogalactanas nas frações, e a presença de ácido galacturônico e ramnose indicam que elas possam estar ligadas na cadeia principal de uma ramnogalacturonana tipo I.

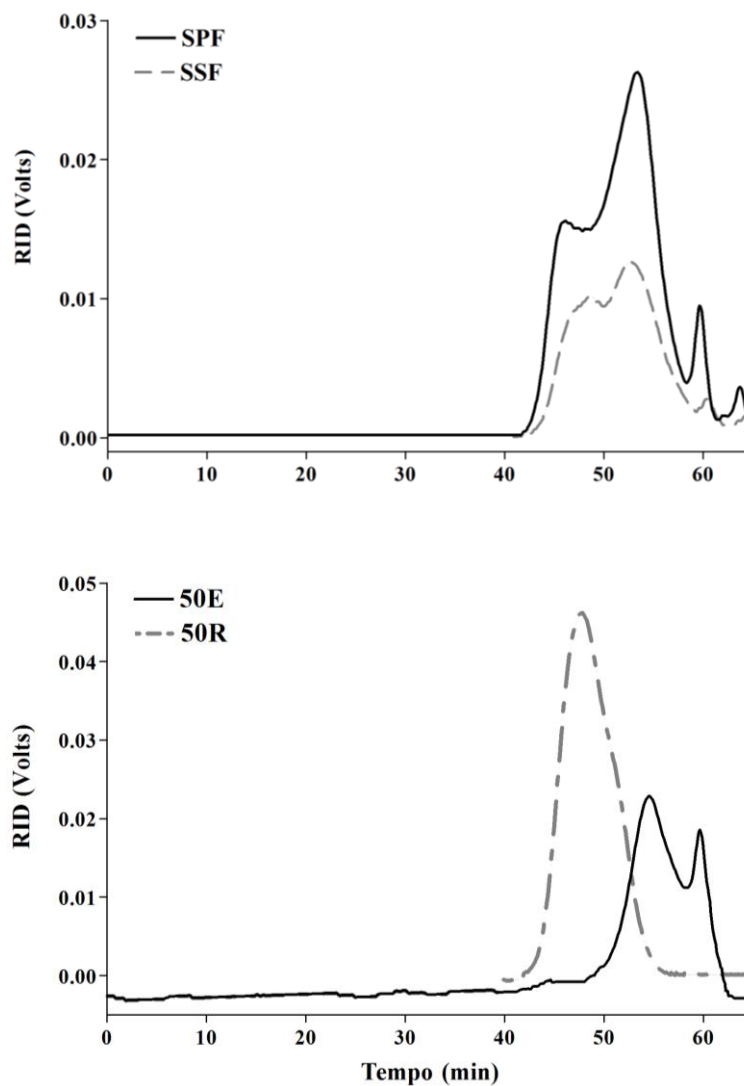


FIGURA 17. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES SSF, SPF, 50E E 50R

Análise de cromatografia em camada delgada (TLC) também foi realizada para a fração 50R para confirmar a identidade do ácido urônico presente na fração. Pode-se verificar que para esta fração o monossacarídeo ácido foi o GalA (FIGURA 18).

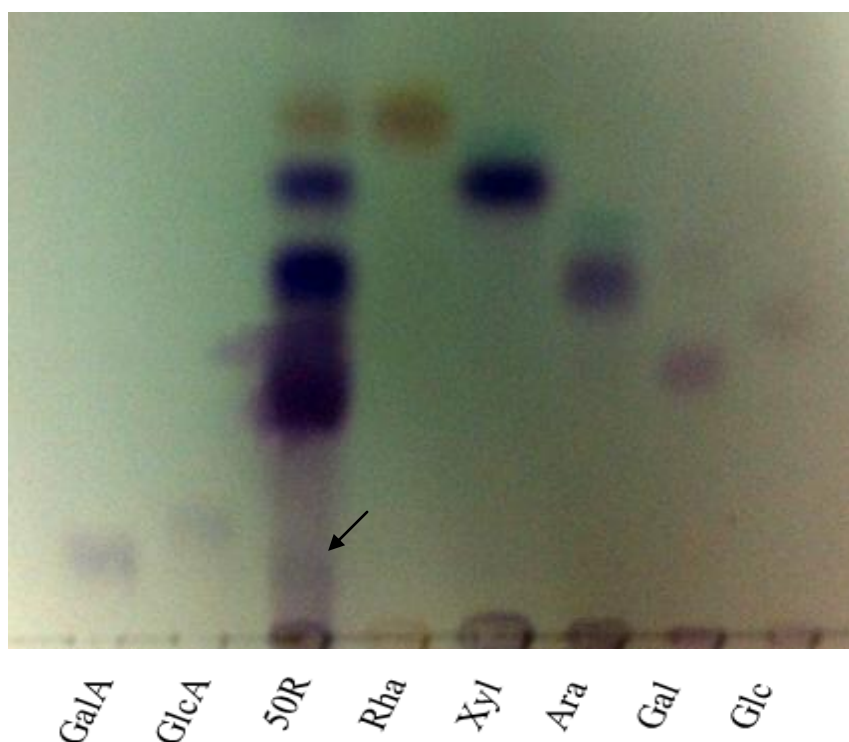


FIGURA 18. TLC DA FRAÇÃO 50R OBTIDA DA POLPA DO TAMARILLO (*S. betaceum*). A seta indica a presença de GalA na fração

De modo geral, pode-se observar através dos espectros de RMN- ^{13}C (FIGURA 19), que as frações 50E e 50R possuem grande complexidade, apresentando muitos sinais na região anomérica (97,5-109,1 ppm). O sinal observado em 104,3 corresponde ao C1 de unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, enquanto os outros carbonos do anel foram atribuídos aos demais sinais de maior intensidade em 77,6 (C4), 74,5 (C5), 73,4 (C3), 71,9 (C2) e 60,8 (C6) ppm. Os sinais entre 107,0 a 109 ppm observados na fração 50R foram atribuídos ao C1 de unidades de L-Araf. O sinal em 101,6 ppm corresponde ao C1 de unidades de α -D-GalpA e os sinais em 97,5 e 16,6 ppm foram atribuídos ao C1 e C6 de unidades de α -L-Rhap, respectivamente (BOCK e PEDERSEN, 1983; DOURADO *et al.*, 2006; PETERSEN *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010).

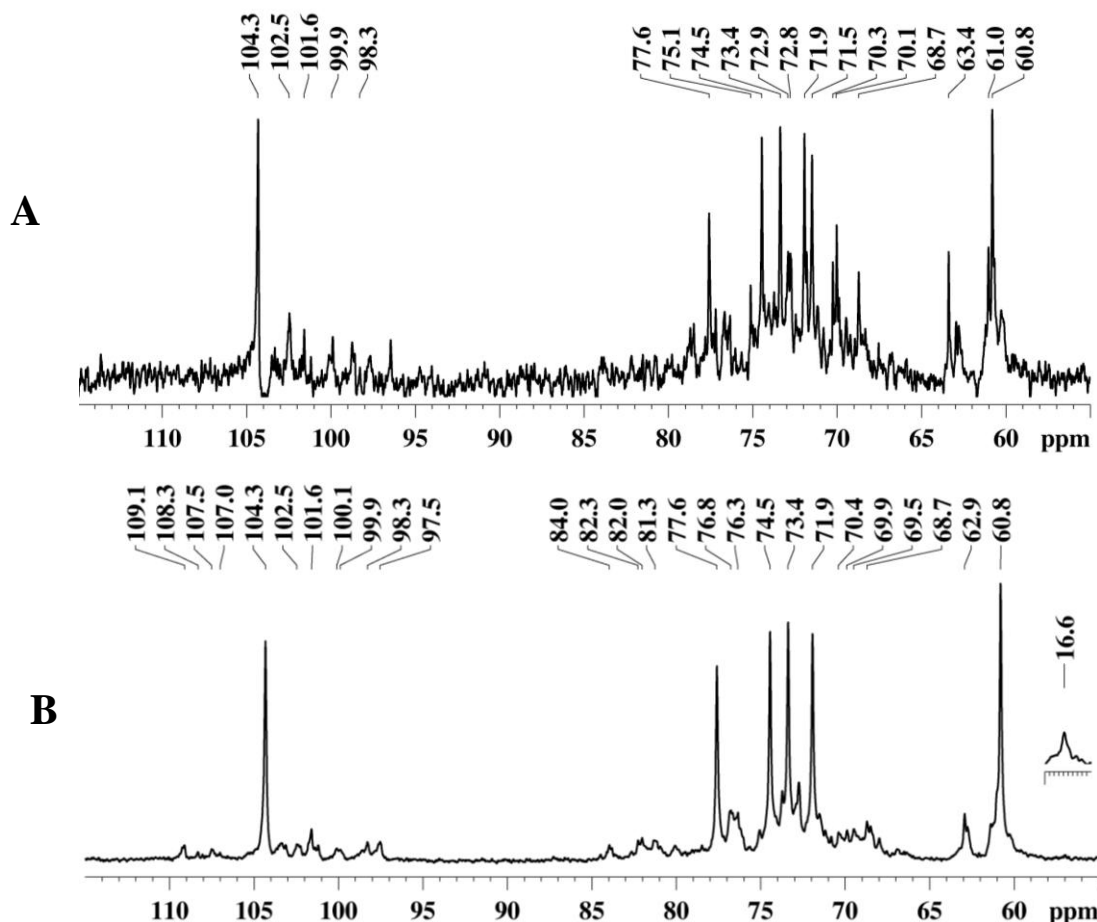


FIGURA 19. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES 50E (A) E 50R (B). Experimentos realizados em D_2O , a 50°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Como a fração 50E apresentou-se heterogênea, a análise de metilação, para caracterização da estrutura, foi realizada apenas para a fração 50R (TABELA 2).

A metilação foi realizada com a fração 50R carboxirreduzida, que apresentou na análise da composição monossacarídica ramnose (14,0%), arabinose (35,4%), xilose (8,6%) e galactose (42,0%). A carboxirredução é necessária uma vez que nas condições de análise adotadas os acetatos de alditóis parcialmente metilados, das unidades de ácidos urônicos, não são analisados. Na análise dos derivados metilados a fração mostrou 2,3,6- Me_3 -Gal, 2,6- Me_2 -Gal e 2,3- Me_2 -Gal, correspondentes a unidades de Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, podendo ser ramificadas em *O*-3 e *O*-6, respectivamente, como as encontradas na cadeia principal de arabinogalactanas tipo I. Porém, esta fração também demonstrou a presença de unidades de Galp substituídas em *O*-6 e di-substituídas em *O*-3 e *O*-6 (derivados metilados 2,3,4- Me_3 -Gal e 2,4- Me_2 -Gal, respectivamente), provavelmente pertencentes de uma pequena porção de

arabinogalactana tipo II, possivelmente ligada a uma cadeia de ramnogalacturonana. No entanto, a ocorrência de variações estruturais dentre arabinogalactanas diferentes foi recentemente relatado, como exemplo, a presença de unidades β -Galp (1 \rightarrow 3) ligadas e (1 \rightarrow 3,6) ligadas inseridas na cadeia principal de algumas arabinogalactanas tipo I (HINZ *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2010). Portanto, a hipótese de que estas unidades de β -Galp pertençam à arabinogalactana tipo I da fração 50R não pode ser descartada.

Do mesmo modo, também não se pode concluir o local onde as unidades de Xylp poderiam estar inseridas na fração pectica 50R. A presença dessas unidades foi confirmada pelo aparecimento do derivado metilado 2,3-Me₂-Xyl. Experimentos futuros seriam necessários para elucidar esta questão.

TABELA 2. ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO 50R OBTIDA DA POLPA DE TAMARILLO (*S.betaceum*)

Alditóis acetatos parcialmente <i>O</i> -metilados	50R ^b	Tipo de ligação correspondente ^c
2,3,5-Me ₃ -Ara ^a	15,0	Araf-(1 \rightarrow
2,5-Me ₂ -Ara	3,2	\rightarrow 3)-Araf-(1 \rightarrow
2,3-Me ₂ -Ara	13,2	\rightarrow 5)-Araf-(1 \rightarrow
2-Me-Ara	5,4	\rightarrow 3,5)-Araf-(1 \rightarrow
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	11,0	Galp-(1 \rightarrow
	4,0	\rightarrow 4)-Galp-(1 \rightarrow
2,3,6-Me ₃ -Gal	14,0	\rightarrow 4)-GalpA-(1 \rightarrow ^d
2,3,4-Me ₃ -Gal	2,0	\rightarrow 6)-Galp-(1 \rightarrow
2,6-Me ₂ -Gal	2,0	\rightarrow 3,4)-Galp-(1 \rightarrow
2,3-Me ₂ -Gal	2,7	\rightarrow 4,6)-Galp-(1 \rightarrow
2,4-Me ₂ -Gal	3,8	\rightarrow 3,6)-Galp-(1 \rightarrow
3,4-Me ₂ -Rha	9,1	\rightarrow 2)-Rhap-(1 \rightarrow
3-Me-Rha	5,7	\rightarrow 2,4)-Rhap-(1 \rightarrow
2,3-Me ₂ -Xyl	8,9	\rightarrow 4)-Xylp-(1 \rightarrow

^a 2,3,5-Me₃-Ara = 2,3,5-tri-*O*-metil-arabinitol acetato, etc.

^b % da área do pico de *O*-metil-alditol acetato relativo a área total determinada por GC-MS. As amostras foram carboxirreduzidas pelo método da carbodiimida (TAYLOR e CONRAD, 1972) antes da análise de metilação.

^c Baseado nos derivados *O*-metil-alditóis acetatos.

^d Deduzido pela proporção de GalA e Gal presentes na análise monossacarídica das frações nativa e carboxirreduzida.

Ainda, de acordo com a análise de metilação, a fração 50R apresenta cadeias laterais de arabinogalactanas formadas por arabinanas (1→5) ligadas, podendo ser ramificadas exclusivamente em *O*-3, por arabinanas (1→3) ligadas e por unidades não redutoras de Araf. As unidades de Galp não redutoras podem estar ligadas diretamente a uma cadeia principal de galactana ou em uma unidade de arabinose. Em relação à ramnogalacturonana, o derivado metilado 3,4-Me₂-Rha demonstra a presença de unidades de Rhap (1→2) ligadas. Além disso, o derivado 3-Me-Rha indica a presença de unidades de Rhap 2,4-di-*O*-substituídas, que são os pontos de inserção de arabinogalactanas tipo I.

De acordo com os resultados apresentados, 50R é constituída principalmente por arabinogalactanas tipo I, inseridas provavelmente em ramnogalacturonanas tipo I.

As principais fontes de arabinogalactanas tipo I são sementes, bulbos, folhas e coníferas (CLARKE, ANDERSON e STONE, 1979). Em frutas, AG-I foi detalhadamente caracterizada apenas no cajá (IACOMINI *et al.*, 2005) e sua presença sugerida em estudos com o kiwi amarelo (*Actinidia chinensis*) e verde (*Actinidia deliciosa*) (SILVA *et al.*, 2012), noni (*Morinda citrifolia*) (BUI, BACIC e PETTOLINO, 2006), laranja doce (*Citrus sinensis*) (PRABASARI *et al.*, 2011) e com a goiaba (*Psidium guajava* L.) (MARCELIN, WILLIAMS e BRILLOUET, 1993).

5.2 POLISSACARÍDEOS DA EXTRAÇÃO ALCALINA

O resíduo da extração aquosa foi submetido à extração alcalina com KOH 10% para retirada de polissacarídeos mais firmemente ligados à parede celular e gerou a fração TK após a neutralização e diálise do extrato obtido (FIGURA 7, p. 44), com rendimento de 1,3 g (0,8%, em relação à polpa deslipidificada) (TABELA 3). Rendimento este, muito inferior ao encontrado na fração TW proveniente da extração aquosa que foi de 20,4 g (11,8%, em relação à polpa deslipidificada) (TABELA 1, p.57)

Esta fração alcalina apresentou arabinose, xilose, galactose e glucose como monossacarídeos neutros majoritários, sendo que a dosagem de ácidos urônicos não foi realizada para essa fração (TABELA 3). Esta fração foi submetida ao procedimento de congelamento e degelo, obtendo-se a fração insolúvel (PTK) e a fração solúvel (STK) em água fria.

TABELA 3. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ALCALINAS OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (*S.betaceum*)

Frações	⁽¹⁾ Rendimento		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	⁽²⁾ Ac. Uron.
	(g)	%								
TK	1,3	0,8	3,5	11,1	38,1	13,5	6,3	12,6	14,9	ND
PTK	0,32	0,18	2,3	1,7	34,2	4,0	-	7,8	48,0	2,0
PTK-Amil	0,16	0,09	-	-	18,8	43,2	-	27,5	10,5	ND
STK	0,9	0,52	4,3	-	18,0	24,0	-	14,3	32,1	7,3
STK-300R	0,3	0,17	-	-	20,0	72,0	-	0,5	-	7,5
STK-1000E	0,08	0,05	-	-	10,6	75,6	-	1,8	-	12,0
STK-1000R	0,18	0,10	-	-	12,4	73,6	-	2,7	-	11,3
STK-300E	0,6	0,35	2,0	-	31,5	43,5	-	14,5	2,5	6,0
PF	0,15	0,08	-	-	22,0	62,0	-	5,0	-	11,0
SF	0,09	0,05	13,2	-	21,6	6,2	-	44,5	9,1	5,2

Notas: Análise dos acetatos de alditóis por GLC e/ou GC-MS. (1) partindo de 173 g de polpa deslipidificada; (2) determinação de ácidos urônicos segundo Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose); Fuc (fucose); Ara (arabinose); Xyl (xilose); Man (manose); Gal (galactose); Glc (glucose); Ác. Uron. (ácido urônico); ND – não determinado.

A fração PTK apresentou na sua composição predominantemente arabinose (34,2%) e glucose (48,0%) (TABELA 3). O espectro RMN-¹³C apresenta sinais em 100,1, 78,9, 73,4, 72,0, 71,7 e em 60,8 ppm referentes ao C1, C4-substituído, C3, C2, C5, C6, respectivamente, de unidades de Glcp (1→4) ligadas, indicando a presença de amilose (FIGURA 20) (FALK e STANEK, 1997). O sinal em 108,1 ppm foi atribuído ao C1 de unidades de α-L-Araf (1→5) ligadas, além dos sinais em 82,2, 81,6, 77,6 e 67,2 atribuídos ao C4, C2, C3 e C5, respectivamente.

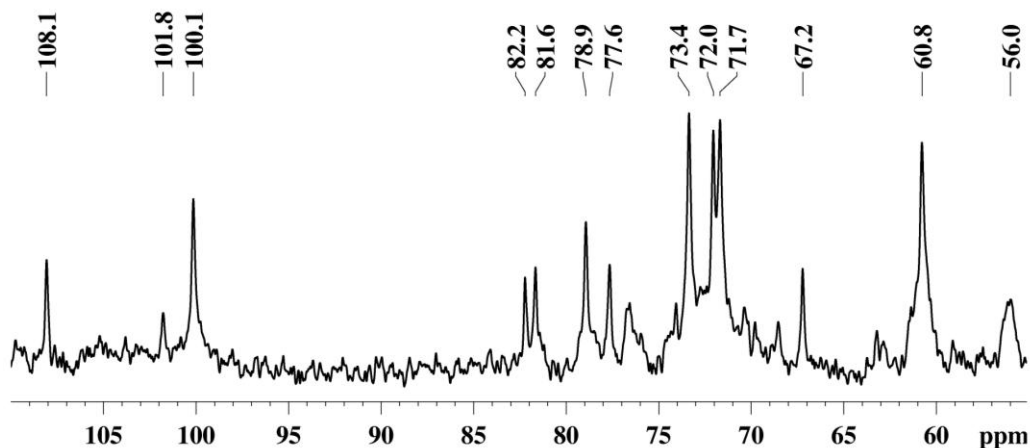


FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO PTK. Experimento realizado em $\text{DMSO-}d_6$, a 70°C , com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Como próximo passo de purificação a fração PTK foi submetida ao tratamento com α -amilase. O procedimento foi efetivo na remoção do teor de glucose, diminuindo-o para 10,5% na fração resultante PTK-Amil (TABELA 3). Porém, esta fração ficou insolúvel em $\text{DMSO-}d_6$, NaOH e NH_4OH após esse procedimento de purificação o que impossibilitou a continuidade ao processo de análise.

5.2.1 Purificação e caracterização estrutural: galactoarabinoglucuronoxilanas

A fração alcalina solúvel em água fria (STK) apresentou uma mistura de polissacarídeos como demonstrado pelo perfil de eluição heterogêneo em HPSEC (FIGURA 21).

Como visto na tabela 3, a fração STK é composta principalmente pelos monossacarídeos neutros arabinose, xilose, galactose e, como observado para as demais frações originadas do procedimento de congelamento e degelo, um alto teor de glucose (32,1%). Desta maneira, STK foi submetida ao tratamento com α -amilase.

A fração, então, foi submetida à ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 300 kDa, no qual foram obtidas duas frações: STK-300R, com o material retido na membrana e a STK-300E, com o material eluído (FIGURA 7, p. 44). Comparando o perfil de eluição em HPSEC das frações geradas pela ultrafiltração

(STK-300R e STK-300E) com a fração STK, observa-se que houve separação de polissacarídeos pelo método (FIGURA 21).

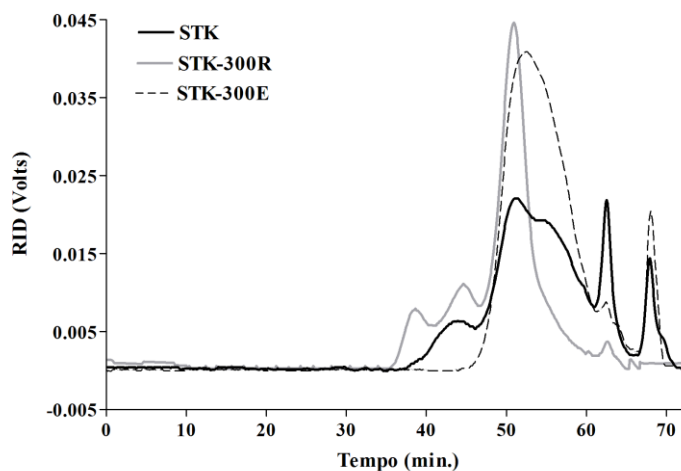


FIGURA 21. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STK, STK300R E STK300E

A fração retida na membrana (STK-300R) mostrou-se ainda heterogênea, com um pico principal no perfil de eluição em HPSEC com tempo de retenção em torno de 50 minutos e dois outros de menor intensidade localizados a esquerda do pico principal, indicando polissacarídeos com massas molares maiores (FIGURA 21). A análise de composição mostrou que esta fração é constituída, sobretudo por xilose (72,0%), arabinose (20%) e ácido urônico (7,5%) (TABELA 3). O espectro de RMN- ^{13}C desta fração (FIGURA 22A), demonstrou a presença de cinco sinais principais referentes a unidades de $\beta\text{-D-Xylp (1}\rightarrow\text{4)}$ ligadas: na região anomérica em 102,0 ppm; e na região do anel em 75,9, 74,2, 72,9 e 63,4 ppm referentes, respectivamente, ao C4-substituído, C3, C2 e C5. O sinal em 108,3 ppm foi atribuído ao C1 de $\alpha\text{-L-Araf}$ e em 59,7 ppm ao 4- O-CH_3 de unidades de 4- O-Me-GlcpA . Esses dados obtidos para STK-300R sugerem que o polissacarídeo presente na fração trata-se de uma heteroxilana ácida.

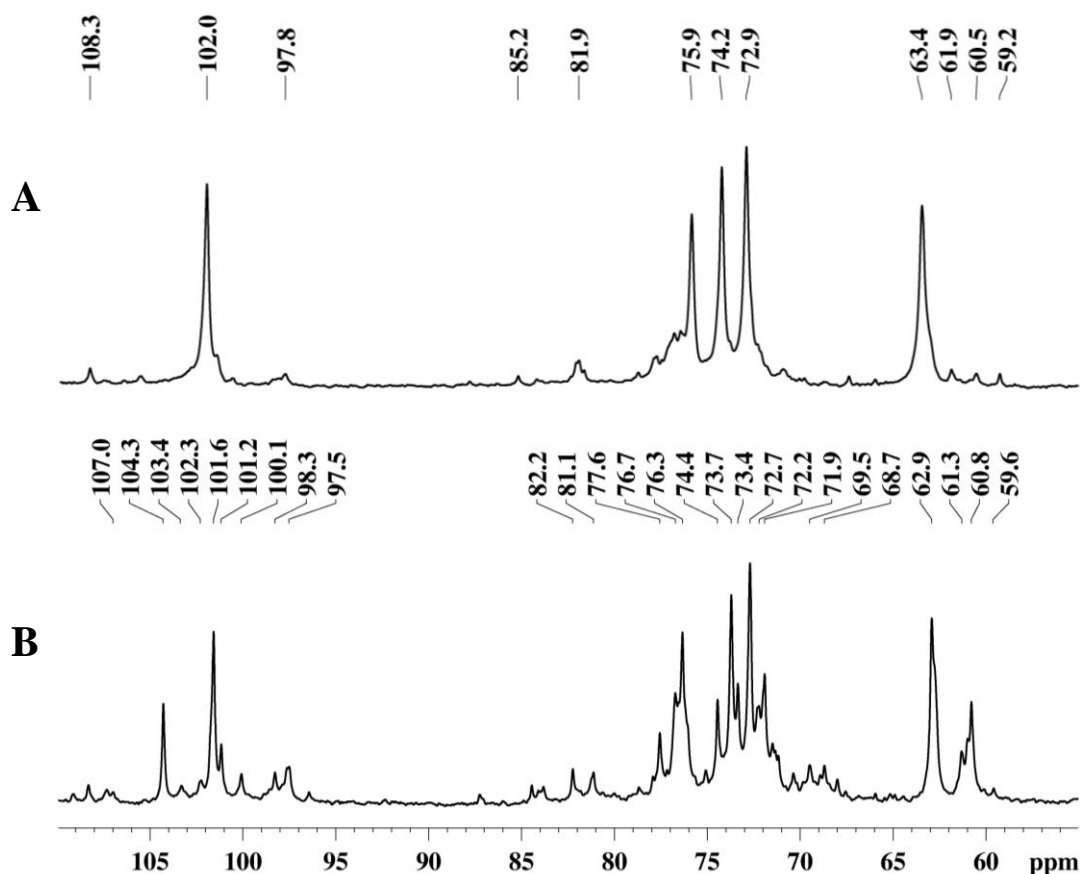


FIGURA 22. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES STK300R (A) E STK300E (B). Experimentos realizados em $\text{DMSO-}d_6$, a 70 °C (STK300R) e em D_2O , a 50 °C (STK-300E), com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

Com o intuito de se obter uma fração homogênea, a fração STK-300R foi dialisada contra água destilada em sacos com limite de exclusão de 1000 kDa por 48 horas, resultando em uma fração eluída (STK-1000E) e uma fração retida (STK-1000R) (FIGURA 7, p. 44).

A análise da composição monossacarídica mostrou um conteúdo similar, de arabinose, xilose, galactose e ácido urônico para as frações STK-1000E e STK-1000R, respectivamente (TABELA 3). Como observado na Figura 23, o perfil de eluição em HPSEC para as duas frações mostraram-se heterogêneas. Entretanto, a análise do espectro de RMN- ^{13}C demonstrou a presença dos mesmos sinais principais com intensidades parecidas (FIGURA 24A e B), indicando a presença de polissacarídeos com estrutura química similar, mas com diferentes massas molares. Por esse motivo, e

por possuir maior rendimento, apenas a fração STK-1000R foi posteriormente estudada.

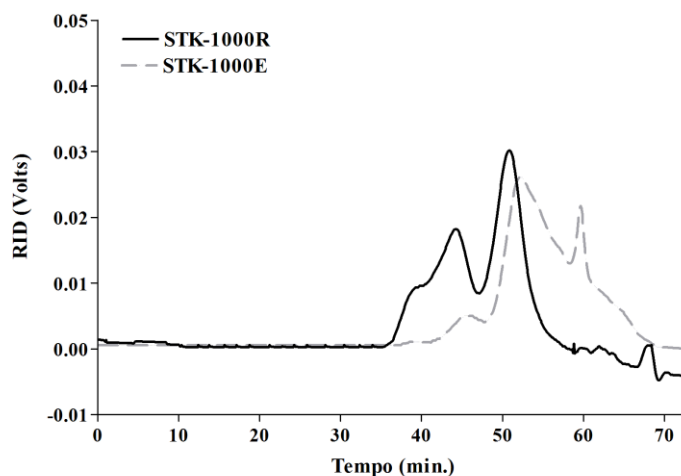


FIGURA 23. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES STK-1000R E STK-1000E

Com o objetivo de confirmar a identidade do ácido urônico presente na STK-1000R, uma alíquota da fração foi carboxirreduzida e analisada por GC-MS. A composição monossacarídica dessa fração apresentou arabinose, xilose, galactose, glucose e 4-*O*-metil-glucose na proporção molar de 9,8:75:2,5:5,1:7,6. A presença de glucose e de 4-*O*-metil-glucose, monossacarídeos que não foram identificados no polissacarídeo nativo, indicam que o ácido urônico é representado pelo ácido glucurônico e pelo ácido 4-*O*-metil-glucurônico.

Devido à presença dos ácidos urônicos, a análise de metilação foi realizada com a fração STK-1000R carboxirreduzida (TABELA 4).

Os resultados indicam um polissacarídeo formada por uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-Xylp (1 \rightarrow 4) ligadas, pouco ramificada, substituída exclusivamente em *O*-2 (devido a presença do derivado 3-*O*-Me-Xyl). As cadeias laterais são formadas por unidades de Araf (1 \rightarrow 5) ligadas e por unidades de GlcpA (1 \rightarrow 4) ligadas, além dos monossacarídeos terminais não redutores de Araf, Arap, Galp, GlcpA e de 4-*O*-Me-GlcpA.

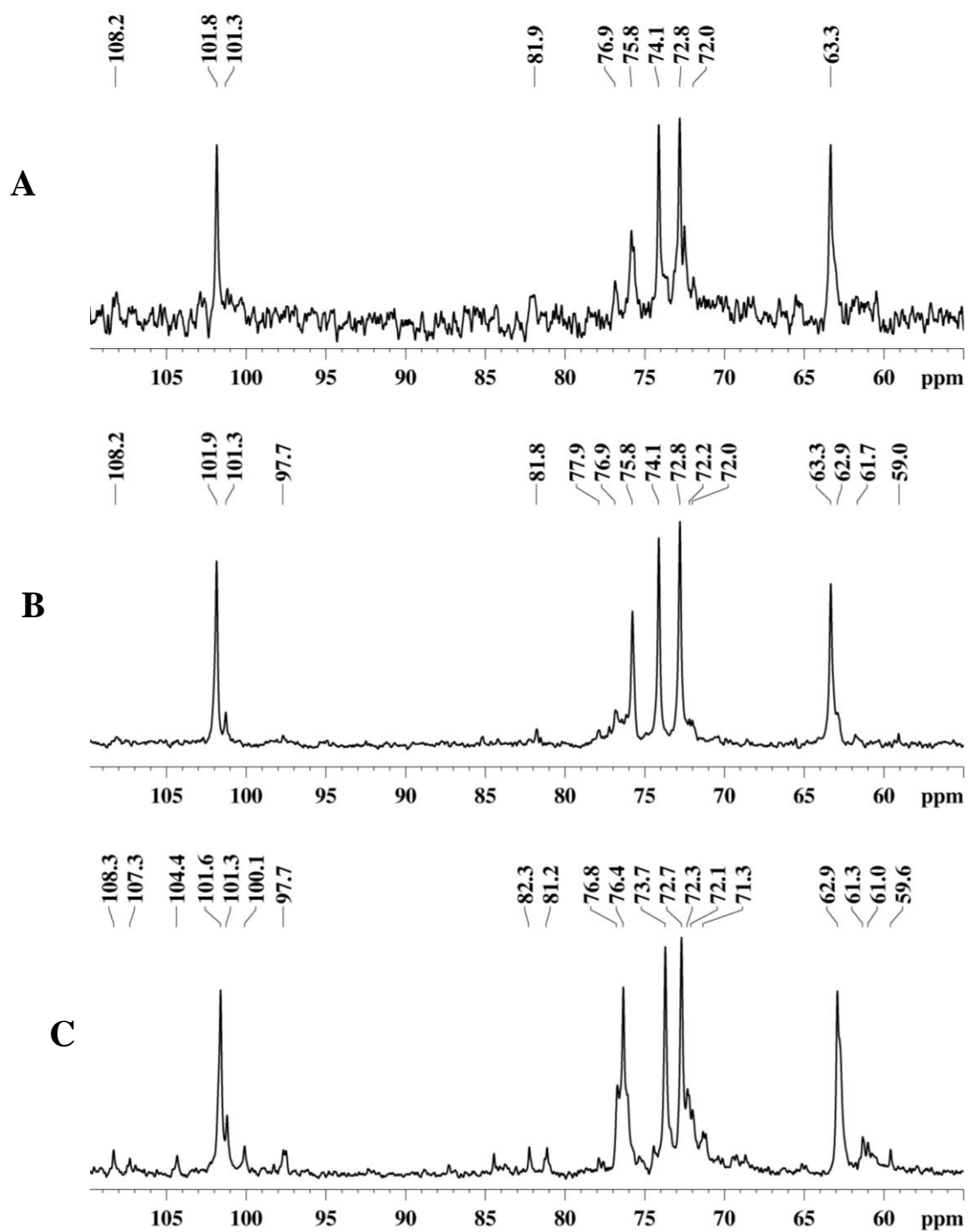


FIGURA 24. ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES STK-1000E (A), STK-1000R (B) E PF (C). Experimentos realizados em $\text{DMSO}-d_6$, a 70°C (STK-1000E e STK-1000R) e em D_2O , a 50°C (PF), com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm

TABELA 4. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES STK-1000R E PF OBTIDAS DA POLPA DE TAMARILLO (*S.betaceum*)

Alditóis acetatos parcialmente <i>O</i> -metilados	STK-1000R ^b	PF ^b	Tipo de ligação correspondente ^c
2,3,5-Me ₃ -Ara ^a	3.0	8.0	Araf-(1→
2,3,4-Me ₃ -Ara	1.0	4.0	Arap-(1→
3,5-Me ₂ -Ara	-	2.0	→2)-Araf-(1→
2,3-Me ₂ -Ara	3.0	1.0	→5)-Araf-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	2.0	5.0	Galp-(1→
2,3-Me ₂ -Xyl	63.0	43.5	→4)-Xylp-(1→
3-Me-Xyl	16.0	25.0	→2,4)-Xylp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	3.0	3.0	GlcA-(1→ ^d
	7.0	7.0	4- <i>O</i> -Me-GlcA-(1→ ^d
2,3,6-Me ₃ -Glc	2.0	1.5	→4)-GlcA-(1→

^a 2,3,5-Me₃-Ara = 2,3,5-tri-*O*-metil-arabinitol acetato, etc.

^b % da área do pico de *O*-metil-alditol acetato relativo a área total determinada por GC-MS. As amostras foram carboxirreduzidas pelo método da carbodiimida (TAYLOR e CONRAD, 1972) antes da análise de metilação.

^c Baseado nos derivados *O*-metil-alditóis acetatos.

^d Deduzido pela proporção de GlcA e 4-*O*-Me-GlcA presentes na análise monossacarídica das frações carboxirreduzidas.

Dados de metilação são confirmados pela análise do espectro de RMN-¹³C (FIGURA 24B), que mostrou cinco sinais principais referentes à cadeia principal formada por unidades de β-D-Xylp 4-*O*-substituídas, com ressonâncias em 101,9 (C1), 75,8 (C4), 74,1 (C3), 72,8 (C2) e 63,3 (C5) ppm. O acoplamento de hidrogênios foi dado pelo experimento de HSQC, sendo atribuídos os sinais em 5,12, 4,42, 4,14, 3,93 e 4,75/4,03 ppm aos hidrogênios H1, H4, H3, H2 e H5/H5', respectivamente (dados não mostrados).

Os pontos de ramificação da cadeia principal são demonstrados pelos sinais de β-D-Xylp 2,4-di-*O*-substituídas em 101,3 (C1), 77,9 (C2), 76,9 (C4) e 62,9 (C5) ppm do espectro de RMN-¹³C. Os sinais em 97,8 (C1), 72,0 (C2), 72,2 (C3), 81,8 (C4), 172,6 (C6, dado não mostrado) e 59,0 (-CHOCH₃-4) demonstram a presença de unidades de 4-*O*-Me-α-D-GlcA. Também foi assinalado um fraco sinal referente ao carbono anomérico de unidades de α-L-Araf em 108,2 ppm. Porém, não foram observados sinais referentes a Arap e Galp que, devido a suas baixas quantidades, não puderam ser detectados pela espectroscopia por RMN-¹³C (FIGURA 24B). Todos os

assinalamentos foram realizados de acordo com dados da literatura (ODONMAZIG *et al.*, 1990; RALET, SAULNIER e THIBAUT, 1993; SHATALOV, EVTUGUIN e PASCOAL-NETO, 1999; MAURER-MENESTRINA *et al.*, 2003; CIPRIANI *et al.*, 2008). Os dados analisados confirmam a presença de uma heteroxilana ácida, a qual foi denominada de galactoarabinoglucuronoxilana.

Quanto a fração eluída na membrana de 300 kDa (STK-300E) os principais monossacarídeos encontrados foram a arabinose, xilose, galactose e ácido urônico (TABELA 3, p. 74). Apesar do HPSEC apresentar um perfil de eluição quase homogêneo (FIGURA 21), o seu espectro de RMN-¹³C (FIGURA 22B), mostrou um grande número de sinais, indicando a presença de mais de um polissacarídeo, com estruturas químicas diferentes, mas com massas molares similares na fração. Sinais estes, mais intensos, identificados como referentes aos cinco sinais de unidades de β -D-Xylp 4-O-substituídas da cadeia principal da heteroxilana ácida previamente caracterizada, bem como seis sinais correspondentes à unidades de β -D-Galp 4-O-substituídas em 104,3 (C1), 77,6 (C4), 74,5 (C5), 73,4 (C3), 71,9 (C2) e 60,8 (C6) ppm, respectivamente (TANAKA *et al.*, 2010).

Na tentativa de separar estes polissacarídeos, a fração STK-300E foi submetida a mais uma etapa de purificação através do tratamento com a solução de Fehling, uma vez que xilanas podem precipitar na presença de cobre em meio alcalino. Os componentes sobrenadantes e precipitados de Fehling foram chamados de SF e PF respectivamente (FIGURA 7, p. 44).

Como constatado no perfil de eluição de HPSEC (FIGURA 25) e na composição monossacarídica (TABELA 3) essa estratégia de purificação mostrou-se altamente eficiente na separação dos dois polímeros que tinham estruturas químicas diferentes e mesma massa molar. Ambas as frações SF e PF apresentam um pico principal quando analisados por HPSEC, com tempo de retenção entre 50 a 55 minutos, bem como um pequeno ombro à direita (FIGURA 25). Devido à pequena quantidade de amostra, os experimentos de purificação para a remoção desse pequeno ombro não foram continuados.

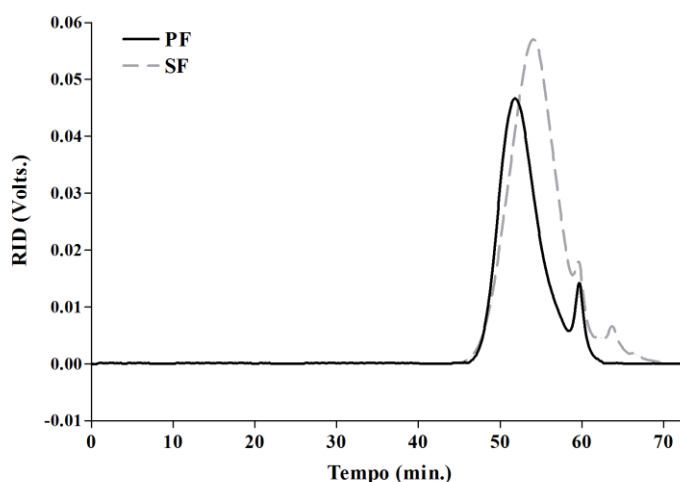


FIGURA 25. PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID), DAS FRAÇÕES SF E PF

O dn/dc e a massa molar (M_w) foram calculados para a fração PF, que corresponderam respectivamente a 0,193 e 22.000 g/mol. Essa fração é composta por arabinose (22,0%), xilose (62,0%), galactose (5,0%) e ácido urônico (11%). Por comparação com a fração STK-1000R, esta composição monossacarídica poderia ser indicativa da presença de uma galactoarabinoglucuronoxilana (TABELA 3).

A fração PF após carboxirredução revelou que o ácido urônico é representado pelo ácido glucurônico (4,4%) e pelo ácido 4-*O*-metil-glucurônico (6,6%). Os demais monossacarídeos apresentados para esta fração foram arabinose (22,9%), xilose (60,4%) e galactose (5,7%).

Devido à presença dos ácidos urônicos, assim como para a fração STK-1000R, a análise dos derivados metilados foi realizada com a fração PF carboxirreduzida (TABELA 4). Com exceção da presença do derivado metilado 3,5-Me₂-Ara, a fração PF demonstrou que possui os mesmos derivados metilados que a fração STK-1000R, sendo exclusivamente ramificada em *O*-2, porém mais ramificada e com maiores proporções de terminais não redutores de Araf, Arap e Galp.

A pequena quantidade de unidades de Galp presentes nas análises de metilação tanto para a frações PF quanto para STK-1000R (descrita acima) como terminal não redutor, foram consideradas como pertencentes à estrutura da heteroxilana ácida, devido a ausência de outros derivados metilados, que poderiam ser atribuídos a uma

contaminação por arabinogalactana péctica. Uma detalhada investigação da literatura mostrou que a galactose está presente na estrutura de algumas xilanas isoladas de diferentes fontes. Nesses estudos, as unidades de galactose também aparecem como terminais não redutores e na forma piranosídica, como por exemplo, nas heteroxilanas da haste da *Avena sativa* (aveia comum) (BUCHALA, WILKIE e FRASER, 1972), nas folhas de *Hordeum vulgare* (cevada) (BUCHALA, 1973), nas cascas do grão do sorgo (WOOLARD, RATHBONE e NOVELLIE, 1977), no sabugo de milho (EBRINGEROVÁ *et al.*, 1992), na madeira de *Eucalyptus globulus* L. (SHATALOV, EVTUGUIN e PASCOAL-NETO, 1999), nas folhas de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira-santa) (CIPRIANI *et al.*, 2008) e de *Phyllanthus niruri* (Quebra-pedra) (MELLINGER *et al.*, 2005).

Corroborando com os dados de metilação e composição monossacarídica, o espectro de RMN-¹³C da fração PF (FIGURA 24C) mostrou-se bastante similar ao espectro da fração STK-1000R (FIGURA 24B). Mas, observam-se sinais mais intensos referentes a unidades de α -L-Araf em 107,3 e 108,3 ppm, de β -Arap em 100,1 ppm e de β -D-Galp em 104,4 ppm (ODONMAZIG *et al.*, 1990; RALET, SAULNIER e THIBAUT, 1993; SHATALOV, EVTUGUIN e PASCOAL-NETO, 1999).

As xilanas constituem a classe de hemiceluloses mais abundantes da parede celular de plantas superiores. Conforme o aumento da complexidade dos substituintes, as xilanas podem ser divididas em três famílias: homoxilanas; heteroxilanas neutras e heteroxilanas ácidas. Homoxilanas foram descritas apenas em folhas de esparto, talos de tabaco, sementes de guar e no amendoim. Heteroxilanas neutras ou arabinoxilanas são comuns em monocotiledôneas como gramíneas e cereais. Já as heteroxilanas ácidas são encontradas usualmente em dicotiledôneas, especialmente em hemiceluloses de madeiras (“*wood xylans*”) e em sementes. As heteroxilanas podem variar de acordo com os substituintes presentes nas cadeias laterais, que podem ser constituídos apenas por monossacarídeos não redutores, oligossacarídeos, arabinanas e/ou grupos não sacarídeos (acetil e ácido ferúlico) (JOSELEAU, COMTAT e RUEL, 1992).

Usualmente, as heteroxilanas ácidas são descritas contendo apenas cadeias laterais formadas por ácido glucurônico e/ou 4-*O*-metil-glucurônico, como exemplo,

as glucuronoxilanas presentes nas sementes de *Opuntia ficus-indica* (HABIBI, MAHROUZ e VIGNON, 2002), sementes de nabo (*Brassica campestris*) (GHOSH *et al.*, 2004), sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) (GHOSH *et al.*, 2005), sementes de argan (*Argania spinosa*) (HABIBI e VIGNON, 2005), polpa de beterraba (DINAND e VIGNON, 2001), na parte aérea de *Rudbeckia fulgida* (KARDOSOVÁ, MATULOVÁ e MALOVÍKOVÁ, 1998), nas folhas de *Pharagmenthera capitata* e de *Fleurya aestuans* (ANGONE *et al.*, 2009), no girrasol (BAZUS *et al.*, 1993) e na vagem de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) (SENGKHAMPARN *et al.*, 2009).

No que se refere à heteroxilanas ácidas já descritas em frutas, estas já foram encontradas no abacaxi (SMITH e HARRIS, 1995), na azeitona (VIERHUIS *et al.*, 2001); uma fruta africana conhecida como katamfe (*Thaumatococcus daniellii*) (ADESINA e HIGGINBOTHAM, 1977); no melão de inverno (MAZUMDER *et al.*, 2005) e no damasco siberiano (ODONMAZIG *et al.*, 1990). Com exceção da heteroxilana ácida descrita para o melão de inverno, em que não se sabe os pontos de ramificação da cadeia principal, as demais citadas acima são di-substituídas em *O*-2 e em *O*-3. Diferentemente, as heteroxilanas encontradas nesse trabalho na polpa do tamarillo apresentam a cadeia principal de xilose ramificada apenas em *O*-2.

5.3 ENSAIO BIOLÓGICO DA GALACTOARABINOGLUCURONOXILANA ISOLADA

Embora a maior parte das atividades biológicas das plantas medicinais seja atribuída aos metabólitos secundários, inúmeros trabalhos demonstram que frações polissacarídicas isoladas de plantas superiores apresentam uma vasta gama de atividades biológicas relacionados com a sua estrutura. O fruto do tamarillo (*Solanum betaceum*) possui entre suas indicações populares os usos em quadros de dor e de inflamação, porém, ambos os efeitos são pouco explorados para polissacarídeos de

plantas. Neste contexto, optou-se por avaliar a propriedade antinociceptiva em modelos de nocicepção inflamatória da primeira fração isolada durante este trabalho, a galactoarabinoglucuronoxilana presente na fração STK-1000R.

No que diz respeito às propriedades biológicas de heteroxilanas ácidas, estudos demonstraram atividade antiúlcera (CIPRIANI *et al.*, 2008), imunológica (PROKSCH e WAGNER, 1987; EBRINGEROVÁ *et al.*, 1998) anticomplemento (SAMUELSEN *et al.*, 1999) e antitussígena (KARDOSOVÁ *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos com a administração intraperitoneal da fração STK-1000R no modelo de contorções induzidas por ácido acético mostrou que nas doses de 0,01-10 mg/kg o efeito antinociceptivo foi dose dependente (FIGURA 26). É bem conhecido que o ácido acético provoca dor de origem inflamatória, pela ativação de nociceptores polimodais e liberação de mediadores como a bradicinina, prostanglandina e citocinas (TNF- α , Il-1 β e IL-8) (RODRIGUES *et al.*, 2012).

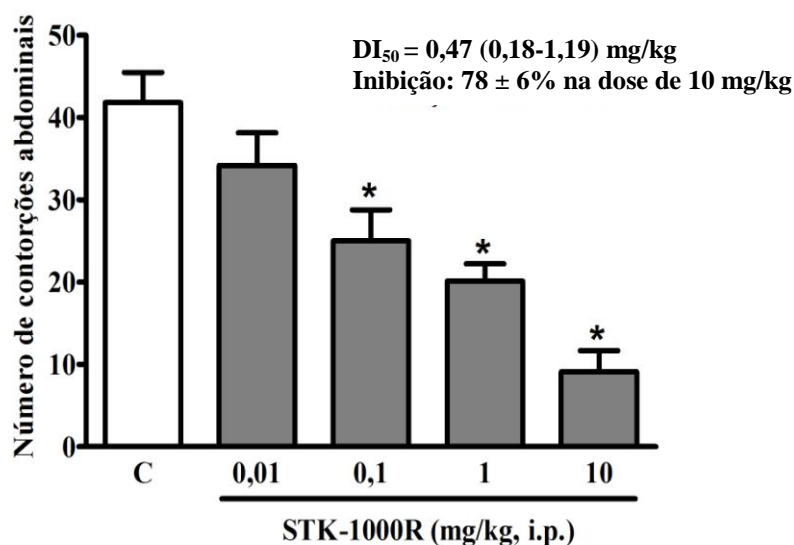


FIGURA 26. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO STK-1000R NA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR 0,6% DE ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C- controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração STK-1000R (0,01-10 mg/kg, i.p.). Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 6- 8 animais por grupo) e comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste Newman Keul's. Diferenças entre grupo veículo (*p < 0.05)

A dose necessária para inibir 50% das contrações (Dose inibitória 50-DI₅₀) foi de 0,47 mg/kg (limite de confiança de 95% entre 0,18 a 1,19 mg/kg), e a dose de 10 mg/kg inibiu o número de contorções em 78 \pm 6%.

Além disso, foi realizado o teste da formalina, o qual permite avaliar a nocicepção nos animais, considerando dois parâmetros: a de dor de origem neurogênica, também chamada de fase I, a qual resulta do efeito direto da formalina nos nociceptores; e a dor de origem inflamatória, ou fase II (TJÖLSEN *et al.*, 1992). Nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, a fração STK-1000R inibiu a resposta nociceptiva induzida pela formalina somente na fase inflamatória (fase II), sendo que a inibição máxima foi de $80 \pm 6\%$ para a dose de 1 mg/kg da fração STK-1000R ($DI_{50} = 0,09$ (0,03-0,23) mg/kg) (FIGURA 27A e B).

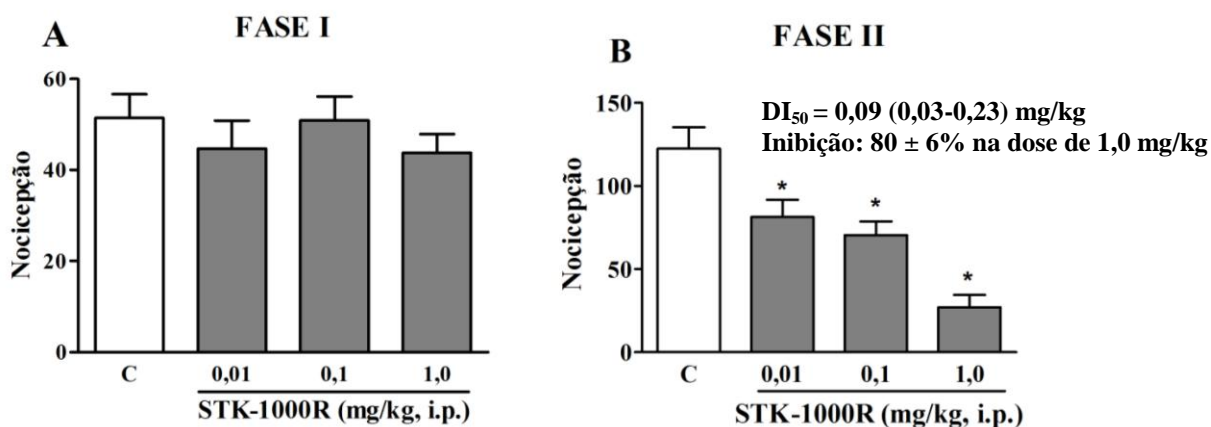


FIGURA 27. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DA FRAÇÃO STK-1000R NA FASE NEUROGÊNICA (A) E FASE INFLAMATÓRIA (B) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com veículo (C - controle, 10 mL/kg, i.p.) ou doses da fração STK- 1000R (0,01-1,0 mg/kg, i.p.). Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 6- 8 animais por grupo) e comparação estatística realizada utilizando ANOVA seguida pelo teste Newman Keul's. Diferenças entre grupo veículo (* $p < 0.05$)

Os resultados obtidos indicam que a galactoarabinoglucuronoxilana presente na polpa do tamarillo (*S. betaceum*) apresenta efeito analgésico em modelos experimentais de nocicepção que envolvem um componente inflamatório.

6. CONCLUSÕES

A partir de extrações aquosas e alcalinas da polpa dos frutos do tamarillo (*Solanum betaceum*), foram obtidos polissacarídeos pécticos e hemicelulósicos. As análises de composição monossacarídica, associadas às análises de RMN-¹³C, HSQC e metilação, sugerem a presença das seguintes estruturas polissacarídicas:

- Uma arabinana linear formada por unidades de α -L-Araf (1→5) ligadas;
- Uma fração péctica contendo uma homogalacturonana formada por unidades de α -D-GalpA (1→4) ligadas altamente metil-esterificada (DE = 71,0%, DA = 1,3%), provavelmente com inserções de ramnogalacturonana tipo I contendo cadeias laterais constituídas principalmente por arabinogalactanas tipo I;
- Arabinogalactanas do tipo I, contendo uma cadeia principal formada por unidades de β -D-Galp (1→4) ligadas, parcialmente substituídas em O-3 por unidades de α -L-Araf;
- Duas galactoarabinoglucuronoxilanas, formadas por unidades de β -D-Xylp (1→4)-ligadas, ramificadas exclusivamente em O-2, sendo uma mais ramificada que a outra. As cadeias laterais são formadas por unidades de α -L-Araf (1→5) ligadas e por unidades de α -D-GlcpA (1→4) ligadas e unidades terminais de α -L-Araf, β -Arap, β -D-Galp, α -D-GlcpA and 4-O-Me- α -D-GlcpA.

A galactoarabinoglucuronoxilana isolada na fração STK-1000R apresentou efeito analgésico através de mecanismos anti-inflamatórios, quando avaliada em teste de contorção abdominal induzida por ácido acético e teste da formalina.

REFERÊNCIAS

- ADESINA, S. K.; HIGGINBOTHAM, J. D. Studies on a novel polysaccharide gel from fruit of *Thaumatococcus daniellii* (Benth). **Carbohydrate Research**, v. 59, n. 2, p. 517-524, 1977.
- ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G.; ONEILL, M. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. **Pectins and Pectinases**, v. 14, p. 47-55, 1996.
- ANGONE, S. A.; BARDOR, M.; NGUEMA-ONA, E.; RIHOUEY, C.; ISHII, T.; LEROUGE, P.; DRIOUICH, A. Structural characterization of cell wall polysaccharides from two plant species endemic to central Africa, *Fleurya aestuans* and *Phragmenthera capitata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 104-109, 2009.
- ASGAR, M. A.; YAMAUCHI, R.; KATO, K. Structural features of pectins from fresh and sun-dried Japanese persimmon fruit. **Food Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 247-251, 2004.
- ASPINALL, G. O. Carbohydrate polymers of plant cell walls. In: LOEWUS, F. (Ed.). **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1973. p.95-115.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K. e CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, 1980. p.473-500.
- ASPINALL, G. O.; COTTRELL, I. W. Polysaccharides of soybeans. VI. Neutral polysaccharides from cotyledon meal. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1019-1022, 1971.
- BARRETO, D. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 287-291, 2006.
- BARSETT, H.; ASLAKSEN, T. H.; DALBY-BROWN, L.; MICHAELSEN, T. E. Difference in structure and complement fixing activity of pectic polysaccharides from different plant parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 4, p. 580-592, 2012.
- BASAK, R. K.; MANDAL, P. K.; MUKHERJEE, A. K. Studies on a neutral polysaccharides isolated from bael (*Aegle marmelos*) fruit pulp. **Carbohydrate Research**, v. 97, p. 315-321, 1981.
- BAZUS, A.; RIGAL, L.; GASET, A.; FONTAINE, T.; WIERUSZESKI, J. M.; FOURNET, B. Isolation and characterization of hemicelluloses from sunflower hulls. **Carbohydrate Research**, v. 243, n. 2, p. 323-332, 1993.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Anthocyanins of the Brazilian fruit *Cyphomandra betaceae*. **Food Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 189-195, 1983.

- BOCK, K.; PEDERSEN, C. C-13 Nuclear Magnetic-Resonance spectroscopy of monosaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 41, p. 27-66, 1983.
- BOHS, L. Ethnobotany of the genus *Cyphomandra* (Solanaceae). **Economic Botany**, v. 43, n. 2, p. 143-163, 1989.
- BOHS, L. *Cyphomandra* (Solanaceae). Monograph. Organization for Flora Neotropica. The New York Botanical Garden. 1994
- BOHS, L. Transfer of *Cyphomandra* (Solanaceae) and its species to *Solanum*. **Taxon**, v. 44, n. 4, p. 583-587, 1995.
- BOYES, S.; STRUBI, P. Organic acid and sugar composition of three New Zealand grown tamarillo varieties (*Solanum betaceum* (Cav)). **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 25, n. 1, p. 79-83, 1997.
- BROWNLEADER, M. D.; JACKSON, P.; MOBASHERI, A.; PANTELIDES, A. T.; SUMAR, S.; TREVAN, M.; DEY, P. M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, n. 2, p. 149-164, 1999.
- BUCHALA, A. J. Arabinogalacto(4-*O*-methylglucurono)-xylan from leaves of *Hordeum vulgare*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 6, p. 1373-1376, 1973.
- BUCHALA, A. J.; WILKIE, K. C. B.; FRASER, C. G. Acidic galactoarabinoxylan from stem of *Avena sativa*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 9, p. 2803-&, 1972.
- BUI, A. K.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1271-1275, 2006.
- BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724-732, 2010.
- CAFFAL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, p. 1879-1900, 2009.
- CAO, L.; LIU, X.; QIAN, T.; SUN, G.; GUO, Y.; CHANG, F.; ZHOU, S.; SUN, X. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: A major constituent of wheat bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 160-164, 2011.
- CAPEK, P.; HRÍBALOVÁ, V.; SVANDOVÁ, E.; EBRINGEROVÁ, A.; SASINKOVÁ, V.; MASAROVÁ, J. Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, n. 1-3, p. 113-119, 2003.
- CAPEK, P. An arabinogalactan containing 3-*O*-methyl-D-galactose residues isolated from the aerial parts of *Salvia officinalis* L. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 8, p. 1390-1393, 2008.

CARDOSO, S. M.; SILVA, A. M. S.; COIMBRA, M. A. Structural characterization of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 10, p. 917-924, 2002.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHAMAN, B. B.; WILHELM, G., *et al* (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville American Society of Plant Physiologists, 2000. p.52-108.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CHEN, Q. S.; JIANG, P.; ZHAO, J. W. Measurement of total flavone content in snow lotus (*Saussurea involucre*) using near infrared spectroscopy combined with interval PLS and genetic algorithm. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 76, n. 1, p. 50-55, 2010.

CHENG, G.; DUAN, X.; JIANG, Y.; SUN, J.; YANG, S.; YANG, B.; HE, S.; LIANG, H.; LUO, Y. Modification of hemicellulose polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. **Food Chemistry**, v. 115, p. 43-47, 2009.

CHURMS, S. C.; MERRIFIELD, E. H.; STEPHEN, A. M.; WALWYN, D. R.; POLSON, A.; VANDERMERWE, K. J.; SPIES, H. S. C.; COSTA, N. An L-arabinan from apple-juice concentrates. **Carbohydrate Research**, v. 113, n. 2, p. 339-344, 1983.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 687-690, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 274-278, 2008.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan - proteins. **Phytochemistry**, v. 18, n. 4, p. 521-540, 1979.

CORDEIRO, L. M. C.; REINHARDT, V. D.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 937-944, 2012.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M. J.; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 607-610, 1998.

DALL'AGNOL, R.; VON POSER, G. L. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 337-341, 2000.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudate: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 3, p. 167-175, 1999.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J. B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p.6-9.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBACK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 159-171, 2001.

DINAND, E.; VIGNON, M. R. Isolation and NMR characterisation of a (4-*O*-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 330, n. 2, p. 285-288, 2001.

DOCO, T.; WILLIAMS, P.; PAULY, M.; O'NEILL, M. A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 253-261, 2003.

DOURADO, F.; CARDOSO, S. M.; SILVA, A. M. S.; GAMA, F. M.; COIMBRA, M. A. NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 1, p. 27-33, 2006.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z. Xylans of industrial and biomedical importance. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 325-346, 1999.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; ALFÖDI, J.; HRÍBALOVÁ, V. The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, n. 3, p. 231-239, 1998.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; ALFÖLDI, J.; BERTH, G. Structural and solution properties of corn cob heteroxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, n. 2, p. 99-105, 1992.

FALK, H.; STANEK, M. Two-dimensional H-1 and C-13 NMR spectroscopy and the structural aspects of amylose and amylopectin. **Monatshefte Fur Chemie/ Chemical Monthly**, v. 128, n. 8-9, p. 777-784, 1997.

FERMENIA, A.; GARCIA-CONESA, M.; SIMAL, S.; ROSSELÓ, C. Characterisation of the cell walls of loquat (*Eriobotrya japonica* L.) fruit tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 169-177, 1998.

FILISETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without Interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

GAN, L.; ZHANG, S. H.; YANG, X. L.; XU, H. B. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum*. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 563-569, 2004.

GHOSH, P.; GHOSAL, P.; THAKUR, S.; LEROUGE, P.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; DRIOUICH, A.; RAY, B. Cell wall polysaccharides of *Brassica campestris* seed cake: isolation and structural features. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 7-13, 2004.

GHOSH, P.; GHOSAL, P.; THAKUR, S.; LEROUGE, P.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; DRIOUICH, A.; RAY, B. Polysaccharides from *Sesamum indicum* meal: Isolation and structural features. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 719-726, 2005.

GONÇALVES, C.; LIMA, L. C. O.; LOPES, P. S. N.; PRADO, M. E. T. Caracterização física, físico-química, enzimática da parede celular em diferentes estágios de desenvolvimento da fruta de figueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 220-229, 2006.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GRASDALEN, H.; BAKØI, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183-191, 1988.

GROSS, K. C.; SAMS, C. E. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. **Phytochemistry**, v. 3, n. 11, p. 2457-2461, 1984.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1593-1598, 2002.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 3, p. 319-329, 2005.

HABIBI, Y.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1431-1436, 2005.

HAN, J. Y. Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt, and beer. **Food Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 131-138, 2000.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivate with hydroxylamine, and its analytical application **The Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

HINZ, S. W. A.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; VINCKEN, J.-P.; A.G.J., V. Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2135-2143, 2005.

HOUBEN, K.; JOLIE, R. P.; FRAEYE, I.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 9, p. 1105-1111, 2011.

IACOMINI, M.; SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; LOPES, L.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J. Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 676-683, 2005.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1-3, p. 9-17, 2002.

INNGJERDINGEN, K. T.; DEBES, S. C.; INNGJERDINGEN, M.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 204-214, 2005.

INNGJERDINGEN, K. T.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; PETERSEN, D.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, M.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1046-1058, 2007.

IZYDORCZYK, M. S.; MACRI, L. J.; MACGREGOR, A. W. Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides - I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, n. 3-4, p. 249-258, 1998.

JIANG, G.; PRASAD, K. N.; JIANG, Y.; YANG, B.; JIA, Y.; SUN, J. Extraction and structural identification of alkali-soluble polysaccharides of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 638-642, 2009.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOSELEAU, J. P.; COMTAT, J.; RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: VISSER, J.; BELDMAN, G., *et al* (Ed.). **Xylans and Xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.1-15.

KARDOSOVÁ, A.; MALOVIKOVÁ, A.; PÄTOPRSTÝ, V.; NOSÁL'OVÁ, G.; MATÁKOVÁ, T. Structural characterization and antitussive activity of a glucuronoxylan from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, n. 1, p. 27-33, 2002.

KARDOSOVÁ, A.; MATULOVÁ, M.; MALOVIKOVÁ, A. (4-O-Methyl--d-glucurono) α -xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *sullivantii* (Boynton et Beadle). **Carbohydrate Research**, v. 308, p. 99-105, 1998.

KOROPATKIN, N. M.; CAMERON, E. A.; MARTENS, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 10, p. 323-335, 2012.

KOU, M. C.; YEN, J. H.; HONG, J. T.; WANG, C. L.; LIN, C. W.; WU, M. J. *Cyphomandra betacea* Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 458-463, 2009.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LI, J.; LI, Q.; PENG, Y.; ZHAO, R.; HAN, Z.; GAO, D. Protective effects of fraction 1a of polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on thymus in tumor-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 350-356, 2010.

LIAO, C. H.; GUO, S. J.; LIN, J. Y. Characterisation of the chemical composition and in vitro anti-inflammation assessment of a novel lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 125, n. 3, p. 930-935, 2011.

LIMA, M. S.; PAIVA, E. P.; ANDRADE, S. A. C.; PAIXAO, J. A. Fruit pectins - A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2010.

LISTER, C. E.; MORRISON, S. C.; KERKHOF, N. S.; WRIGHT, K. M. **The nutrition composition and health benefits of New Zealand tamarillos**. Crop & Food Research Confidential Report n. 128. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, 2005.

LIU, C.; LEUNG, M. Y. K.; KOON, J. C. M.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 11, p. 1634-1641, 2006.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, v. 66 p. 17-22, 1996.

MANDAL, P.; PUJOL, C. A.; DAMONT, E. B.; GHOSHA, T.; RAY, B. Xylans from *Scinaia hatei*: Structural features, sulfation and anti-HSV activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 173-178, 2010.

MANDAL, S.; PATRA, S.; DEY, B.; BHUNIA, S. K.; MAITY, K. K.; ISLAM, S. S. Structural analysis of an arabinan isolated from alkaline extract of the endosperm of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Nata Karanja). **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 471-476, 2011.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, n. 1, p. 11-26, 2004.

MARCELIN, O.; WILLIAMS, P.; BRILLOUET, J. M. Isolation and characterization of the two main cell-wall types from guava (*Psidium guajava* L) Pulp. **Carbohydrate Research**, v. 240, p. 233-243, 1993.

MARTINEZ, R.; TORRES, P.; MENESES, M. A.; FIGUEROA, J. G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1520-1526, 2012.

MAURER-MENESTRINA, J.; SASSAKI, G. L.; SIMAS, F. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of a highly substituted beta-xylan of the gum exudate of the palm *Livistona chinensis* (Chinese fan). **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 18, p. 1843-1850, 2003.

MAZUMDER, S.; LEROUGE, P.; LOUTELIER-BOURHIS, C.; DRIOUICH, A.; RAY, B. Structural characterisation of hemicellulosic polysaccharides from *Benincasa hispida* using specific enzyme hydrolysis, ion exchange chromatography and MALDI-TOF mass spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, n. 2, p. 231-238, 2005.

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Xylans from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 129-132, 2005

MERTZ, C.; GANCEL, A. L.; GUNATA, Z.; ALTER, P.; DHUIQUE-MAYER, C.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; RUALES, J.; BRAT, P. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 381-387, 2009.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

MONDAL, S. K.; RAY, B.; THIBAUT, J. F.; GHOSAL, P. K. Cell-wall polysaccharides from the fruits of *Limonia acidissima*: isolation, purification and chemical investigation. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 2, p. 209-212, 2002.

MORTON, J. F. Tree Tomato. In: MORTON, J. F. (Ed.). **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource Systems, Inc., 1987. p.437-440.

MURALIKRISHNA, G.; THARANATHAN, R. N. Structural features of an arabinan from cowpea (*Vigna sinensis*). **Food Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 245-250, 1986.

MURAYAMA, H.; KATSUMATA, T.; HORIUCHI, O.; FUKUSHIMA, T. Relationship between fruit softening and cell wall polysaccharides in pears after different storage periods. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26 p. 15-21, 2002.

NAVARRO, D. A.; CEREZO, A. S.; STORTZ, C. A. NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 3, p. 255-263, 2002.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 255-269, 2005.

O'NEILL, M. A.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. **Pectic Substances**. Encyclopedia of Life Sciences, 2001. p. 1-11.

ODONMAZIG, P.; BADGAA, D.; EBRINGEROVA, A.; MIHALOV, V.; ALFOLDI, J. An acidic D-xylan from the Siberian apricot (*Armeniaca siberica* L) Fruit. **Carbohydrate Research**, v. 198, n. 1, p. 163-167, 1990.

ORDÓÑEZ, R. M.; ORDÓÑEZ, A. A. L.; SAYAGO, J. E.; MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I. Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from *Cyphomandra betacea* Sendt. fruit. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1187-1191, 2006.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS, A. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. Disponível em <http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>, acessado em 30/01/2012.

OSORIO, C.; HURTADO, N.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; HEREDIA-MIRA, F. J.; MORALES, A. L. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1915-1921, 2012.

OVODOV, Y. S. Polysaccharides of phanerogams: their structure and physiological activity. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 24, n. 7, p. 483-501, 1998.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 610-615, 2009.

OWINO, W. O.; NAKANO, R.; KUBO, Y.; INABA, A. Alterations in cell wall polysaccharides during ripening in distinct anatomical tissue regions of the fig (*Ficus carica* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 1, p. 67-77, 2004.

PANTOJA, L.; PINTO, N. V. D.; LOPES, C.; GANDRA, R.; DOS SANTOS, A. S. Physical and physicochemical characterization of fruits of two varieties of tamarillo originated from the north of Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 916-919, 2009.

PEREIRA, L. D.; DA SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. D. F.; DA SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.

PETERSEN, B. O.; MEIER, S.; DUUS, J. O.; CLAUSEN, M. H. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 16, p. 2830-2833, 2008.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 309-315, 2011.

POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; OVODOVA, R. G.; OVODOV, Y. S. Anti-inflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 281-287, 2005.

PRABASARI, I.; PETTOLINO, F.; LIAO, M. L.; BACIC, A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 484-494, 2011.

PRABHA, T. N.; BHAGYALAKSHMI, N. Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 915-919, 1998.

PRAKASH, R.; JOHNSTON, S. L.; BOLDINGH, H. L.; REDGWELL, R. J.; ATKINSON, R. G.; MELTON, L. D.; BRUMMELL, D. A.; SCHRODER, R. Mannans in tomato fruit are not depolymerized during ripening despite the presence of endo-beta-mannanase. **J Plant Physiol**, v. 169, n. 12, p. 1125-33, 2012.

PRISTOV, J. B.; MITROVIC, A.; SPASOJEVIC, I. A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2255-2259, 2011.

PROHENS, J.; NUEZ, F. The tamarillo (*Cyphomandra betacea*). **Small Fruits Review**, v. 1, n. 2, p. 43-68, 2005.

PROKSCH, A.; WAGNER, H. Structural analysis of a 4-O-methyl-glucuronoarabinoxylan with immunostimulating activity from *Echinacea purpurea*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 1989-1993, 1987.

QIU, J. A.; XUE, X. F.; CHEN, F. D.; LI, C. H.; BOLAT, N.; WANG, X. J.; BAIMA, Y. Z.; ZHAO, Q. A.; ZHAO, D. X.; MA, F. S. Quality evaluation of snow lotus (*Saussurea*): quantitative chemical analysis and antioxidant activity assessment. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 12, p. 1325-1337, 2010.

RALET, M. C.; SAULNIER, L.; THIBAUT, J. F. Raw and extruded fiber from pea hulls. Parte II: structural study of the water-soluble polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, n. 1, p. 25-34, 1993.

RAMIREZ-TRUQUE, C.; ESQUIVEL, P.; CARLE, R. Neutral sugar profile of cell wall polysaccharides of pitaya (*Hylocereus sp.*) fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1134-1138, 2011.

REDGWELL, R. J.; MELTON, L. D.; BRASCH, D. J. Cell-wall polysaccharides of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*): Chemical features in different tissue zones of the fruit at harvest. **Carbohydrate Research**, v. 182, n. 2, p. 241-258, 1988.

RENARD, C. M. G. C.; GINIES, C. Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1042-1049, 2009.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. A. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 929-967, 2001.

RODRIGUES, M. R. A.; KANAZAWA, L. K. S.; DAS NEVES, T. L. M.; DA SILVA, C. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 519-526, 2012.

ROLIN, C. Pectin. In: WHISTLER, R. L. B., J. N. (Ed.). **Industrial Gums**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 10, p.257-293.

ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9135-9141, 2007.

SAKURAI, N.; NEVINS, D. J. Changes in physical properties and cell wall polysaccharides of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pericarp tissues. **Physiology Plant.**, v. 89, p. 681-686, 1993.

SAKURAI, N.; NEVINS, D. J. Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues. **Plant Cell Physiology**, v. 38, n. 5, p. 603-610, 1997.

SAMPIETRO, A. R.; ISLA, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. fruits. **Plant Science**, v. 160, n. 4, p. 659-667, 2001.

SAMUELSEN, A. B.; LUND, I.; DJAHROMI, J. M.; PAULSEN, B. S.; WOLD, J. K.; KNUTSEN, S. H. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, n. 2, p. 133-143, 1999.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative

activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J., *et al* (Ed.). **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. US: CRC Press, v.99, 2008. p.255-276.

SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R.; SCHOLS, H. A.; SAJJAANANTAKUL, T.; VORAGEN, A. G. J. Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1824-1832, 2009.

SEYMOUR, G. B.; COLQUHOUN, I. J.; DUPONT, M. S.; PARSLEY, K. R.; SELVENDRAN, R. R. Composition and structural features of cell-wall polysaccharides from tomato fruits. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 725-731, 1990.

SHARMA, S. K.; LIPTAY, A.; MAGUER, M. L. Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. **Food Research Interantional**, v. 30, n. 7, p. 543-547, 1998.

SHATALOV, A. A.; EVTUGUIN, D. V.; PASCOAL-NETO, C. (2-*O*-alpha-D-galactopyranosyl-4-*O*-methyl-alpha-D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. **Carbohydrate Research**, v. 320, n. 1-2, p. 93-99, 1999.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 887-893, 2001.

SILVA, B. P.; TOSTES, J. B. F.; PARENTE, J. P. Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 516-521, 2000.

SILVA, D. C.; FREITAS, A. L. P.; BARROS, F. C. N.; LINS, K. O. A. L.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FEITOSA, J. P. A.; MACIEL, J. S.; PAULA, R. C. M. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 139-145, 2012.

SIMAS-TOSIN, F. F.; ABUD, A. P. R.; OLIVEIRA, C.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; BUCCHI, D. F.; IACOMINI, M. Polysaccharides from peach pulp: structure and effects on mouse peritoneal macrophages. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2257-2260, 2012.

SMITH, B. G.; HARRIS, P. J. Polysaccharide composition of unignified cell-walls of pineapple [*Ananas comosus* (L) Merr] fruit. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1399-1409, 1995.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 2877-2883, 1989.

STEHMANN, J.R.; MENTZ, L.A.; AGRA, M.F.; VIGNOLI-SILVA, M.; GIACOMIN, L. *Solanaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB024880>>. Acesso em 16.09.2012.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: (Ed.). New York: Academic Press, v.2, 1983. p.98-180.

STEVENS, B. J. H.; SELVENDRAN, R. R. Structural investigation of an arabinan from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 559-561, 1980.

SWAMY, N. R.; SALIMATH, P. V. Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 263-265, 1991.

TAMAKI, Y.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352-361, 2008.

TANAKA, L. Y.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721, 2010.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry-Moscow**, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

THUDE, S.; CLASSEN, B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: an arabinogalactan-protein and an arabinan. **Phytochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1026-32, 2005.

TISCHER, C. A.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astragalus gummifer*). **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 18, p. 1647-55, 2002.

TJÖLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The Formalin Test - an Evaluation of the Method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOGOLA, A.; INNGJERDINGEN, M.; DIALLO, D.; BARSETT, H.; ROLSTAD, B.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 423-431, 2008.

TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; GONDA, R.; KANARI, M.; YAMADA, H.; HIKINO, H. Anticomplementary and hypoglycemic activity of okra and hibiscus mucilages. **Carbohydrate Research**, v. 190, n. 2, p. 323-328, 1989.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, v. 56, n. 2, p. 231-239, 1989.

VASCO, C.; AVILA, J.; RUALES, J.; SVANBERG, U.; KAMAL-ELDIN, A. Physical and chemical characteristics of golden-yellow and purple-red varieties of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 278-288, 2009.

VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; O'NEILL, M. A.; PELLERIN, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 315-323, 2001.

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 51-62, 2001.

VILLETZAZ, J. C.; AMADO, R.; NEUKOM, H. Structural investigations of na arabinan from grape juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, p. 101-105, 1981.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBEAULT, J.-F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.287-340.

WANG, J.; FLAISHER-GRINBERG, S.; LIU, H.; SUN, L.; ZHOU, Y.; EINAT, H. Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 65-69, 2010.

WANG, L. S.; ZHAO, D. Q.; DI, L.; XU, T. H.; LIN, X. P.; YANG, B.; ZHOU, X. F.; YANG, X. W.; LIU, Y. H. The analgesic and anti-rheumatic effects of *Thladiantha dubia* fruit crude polysaccharide fraction in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1381-1387, 2011.

WEI, W.; ZHOU, W.; ZANG, N.; JIANG, L. Structural analysis of a polysaccharide from *Fructus Mori Albae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 341-344, 2007.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211-215, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963b.

WOOLARD, G. R.; RATHBONE, E. B.; NOVELLIE, L. Heteroxylan from husk of Sorghum grain. **Phytochemistry**, v. 16, n. 7, p. 957-959, 1977.

WU, Y.; CUI, S. W.; TANG, H.; WANG, Q.; GU, X. H. Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 437-443, 2007.

XU, C.; MOORE, C. H.; FOUNTAIN, D. W.; YU, P. L. Purification and characterization of a new lectin from tamarillo fruit (*Cyphomandra betacea*). **Plant Science**, v. 81, n. 2, p. 183-189, 1992.

XU, Y.; DONG, Q.; QIU, H.; CONG, R.; DING, K. Structural characterization of an arabinogalactan from *Platycodon grandiflorum* roots and antiangiogenic activity of its sulfated derivative. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 2558-2566, 2010.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, n. 4, p. 269-276, 1994.

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J. C.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; SHIMADA, K. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 144, n. 1, p. 101-111, 1985.

YANG, B.; WANG, J.; ZHAO, M.; LIU, Y.; WANG, W.; JIANG, Y. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 634-638, 2006.

YANG, L. Q.; ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349-361, 2009.

YAPO, B. M. Pineapple and banana pectins comprise fewer homogalacturonan building blocks with a smaller degree of polymerization as compared with yellow passion fruit and lemon pectins: implication for gelling properties. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 717-721, 2009.

YAPO, B. M. Pectic substances: from simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.

YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Mango ripening—chemical and structural characterization of pectic and hemicellulosic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1335-1342, 2005.

YI, T.; ZHAO, Z. Z.; YU, Z. L.; CHEN, H. B. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as "Snow Lotus" herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 405-411, 2010.

YI, Y.; ZHANG, M.-W.; LIAO, S.-T.; ZHANG, R.-F.; DENG, Y.-Y.; WEI, Z.-C.; TANG, X.-J.; ZHANG, Y. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 636- 643, 2012.

YOON, S. J.; PEREIRA, M. S.; PAVAO, M. S. G.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; MOURÃO, P. A. S. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thrombosis Research**, v. 106, n. 1, p. 51-58, 2002.

YORK, W. S.; KOLLI, V. S. K.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 99-128, 1996.

ZHAO, Z.; LI, J.; WU, X.; DAI, H.; GAO, X.; LIU, M.; TU, P. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. jinsixiaozao Hort. **Food Research International**, v. 39, p. 917-923, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90 p. 1395- 1410, 2012.